

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ADRIANO MARCELO MORGON

CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE UMA NOVA ISOFORMA DE
METALOPROTEASE DO TIPO ASTACINA PRESENTE NO VENENO DE
ARANHA-MARROM (*Loxosceles intermedia*)

CURITIBA
2013

ADRIANO MARCELO MORGON

CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE UMA NOVA ISOFORMA DE
METALOPROTEASE DO TIPO ASTACINA PRESENTE NO VENENO DE
ARANHA-MARROM (*Loxosceles intermedia*)

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção de grau de Mestre em Biologia
Celular e Molecular, no Curso de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Molecular,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Olga Meiri Chaim

Co-Orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

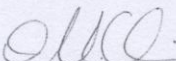
CURITIBA
2013

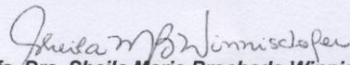
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

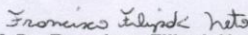
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Profa. Dra. Olga Meiri Chaim
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná


Profa. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer
Universidade Federal do Paraná - UFPR

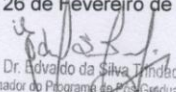

Prof. Dr. Francisco Filipak Neto
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Suplente:

Prof. Dr. Silvio Marques Zanata
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir o mestrando **Adriano Morgon**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Clonagem e expressão heteróloga de uma nova isoforma de metaloprotease do tipo astacina presente no veneno de aranha marrom (*Loxosceles intermedia*)", são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do acadêmico, habilitando-o ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular. A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 26 de Fevereiro de 2013


Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

AGRADECIMENTOS

Aos membros da banca avaliadora desta dissertação, Prof^a. Dr^a. Sheila Maria Brochado Winnischofer (titular), Prof. Dr. Francisco Filipak Neto (titular) e Prof. Dr. Silvio Marques Zanata (suplente), por dispor de seu tempo e conhecimento para contribuir com novas ideias para o desenvolvimento de trabalhos futuros,

Aos grandes mestres Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga e Prof. Dr^a. Andrea Senff-Ribeiro por construir e manter a cada dia o Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos da Universidade Federal do Paraná, por nos guiarem no caminho científico como excelentes tutores, passando ativamente seus conhecimentos para os integrantes do laboratório, além de serem grandes exemplos a serem seguidos,

Especialmente a minha orientadora e grande amiga Olga Meiri Chaim, a qual desde o início, quando bati a sua porta pedindo para ser aluno de mestrado, acreditou e depositou sua confiança em meu trabalho. Agradeço também por observar de perto meus erros e acertos, elogiando a cada acerto, e mais importante, dando extremo apoio a cada erro, me mostrando o melhor caminho a ser seguido. Agradeço também por ser quem eu me espelharei por ser uma grande cientista e uma grande pessoa, a qual possuirei eterna admiração,

Especialmente a grande amiga Luiza Gremski (Lú), por todos os ensinamentos que me passou durante este período, acompanhando de perto o desenvolvimento do projeto, sempre dando excelentes conselhos e guiando meu caminho junto com os orientadores, e também por ser um exemplo a ser seguido, como profissional e também como pessoa, sempre bem humorada e mostrando (mesmo sem saber) que independente do que acontecia no laboratório, tudo iria dar certo no final,

Especialmente a grande amiga Dilza Trevisan-Silva (Dil), a qual também me refiro carinhosamente como “irmã-metalô”. É outra pessoa na qual sempre me espelharei. Sempre sorrindo, dando total apoio a todos do laboratório, nos auxiliando e também nos aguentando. Eu mesmo não podia a ver por perto que já gritava “Dilll, deixa eu perguntar uma coisa...”. Ah, irmã-metalô porque trabalha com metaloproteases do tipo astacina, e foi minha segunda grande mestra, a qual expresso minha profunda admiração, como profissional e como pessoa. Fora do laboratório, estive sempre compartilhando de momentos de descontração como corridas de kart, guerras no paintball, além de ser a grande companheira nas corridas da equipe “pé-na-tábua”,

Especialmente a grande amiga Valéria Ferrer (Val), a qual é também a pessoa que me espelhei desde que entrei no laboratório, como profissional e como pessoa. Sempre sorridente e paciente acompanhou de perto o desenvolvimento do projeto assim como a Dil e obviamente os orientadores, dando dicas, apoiando quando tudo parecia perdido, e mostrando que a

determinação e persistência são extremamente importantes quando se é um cientista. A Val também acompanhou de perto alguns desastres meus dentro e fora do laboratório, compartilhando de boas risadas comigo e com o Matheus Régis Belisário,

Ao amigo Fernando Hitomi Matsubara, por auxiliar sempre que precisei, dando boas dicas e total apoio durante o projeto. Por ser um grande cientista, o qual foi fonte de inspiração no dia de sua defesa de mestrado, quando eu estava apenas começando no laboratório e ao assistir sua defesa, decidi que naquele dia eu iria dar o melhor de mim e buscar realizar o melhor trabalho possível durante o mestrado, assim como ele o fez. Agradeço também por ser um grande amigo e compartilhar de momentos de descontração dentro e fora do laboratório, também compartilhando de boas risadas,

A amiga Ana Carolina Martins Wille, por estar sempre de bom humor, compartilhando de momentos de descontração, e também por demonstrar grande determinação como profissional e como pessoa, o que certamente foi, e ainda é admirado por mim,

A amiga Marianna Bóia, por ser exemplo de determinação e dedicação na vida profissional e pessoal, além de compartilhar de bons momentos de descontração, além de ser grande companheira de corridas de kart, guerras no paintball e de corridas na equipe “pé-na-tábua”,

A amiga Aline Viana Bednaski, por ser também um exemplo de determinação e dedicação, além de ter sido uma das primeiras pessoas com quem conversei no laboratório, logo que ingressamos no mestrado. Por me lembrar de datas importantes durante esses 2 anos de formação, e também compartilhar de bons momentos de descontração, dentro e fora do laboratório, por vezes me chamando de “Geraaaaldo”, além de ser companheira de corridas de kart (um tanto quanto agressiva atrás do volante), guerras no paintball e de corridas na equipe “pé-na-tábua”,

A grande amiga Larissa Vuitika, a qual foi responsável por me ensinar como tudo funcionava no laboratório após minha entrada no grupo, participando do projeto e dando dicas e soluções de problemas, além de dar força nos momentos difíceis e acreditar que tudo iria dar certo no final. Agradeço também por ser uma grande amiga dentro e fora do laboratório, sempre disposta a ajudar em experimentos ou a simplesmente ir almoçar no shopping, junto com o Matheus Régis Belisário,

Ao grande amigo Gabriel Otto Meissner, por compartilhar de sua experiência na vida científica, dando bons conselhos e direções, acompanhando de perto o desenvolvimento do projeto, assim como a Dilza, a Valéria e a Luiza (além dos orientadores), e também por ser um exemplo de dedicação, responsabilidade e persistência a ser seguido, de modo que me espelhei em suas atitudes para dar o meu melhor, além de ser o grande parceiro de assuntos sobre motociclismo, um vício para ambos, e também grande parceiro de corridas de kart (bons “pegas” na disputa de posição),

guerras de paintball e corridas com a equipe “pé-na-tábua”, sem mencionar as conversas descontraídas com o Thiago,

Ao grande amigo Thiago Lopes De-Mari, por ser um exemplo profissional e pessoal a ser seguido, demonstrando responsabilidade, dedicação e persistência em seu trabalho. Além disso, como pessoa, expresse minha admiração por estar sempre buscando o melhor, com tamanha determinação que me serviu de inspiração para dar o meu melhor, como profissional e como pessoa. Agradeço também por ser um grande companheiro de atividades dentro e fora do laboratório, desde as indicações de excelentes músicas, jogos de futebol na TV e lutas no videogame, até viagens, corridas de kart, guerras no paintball e corridas com a equipe “pé-na-tábua”, além das conversas intelectuais e outras não tão intelectuais assim, que proporcionam momentos de aprendizado e descontração,

Ao grande amigo Matheus Regis Belisário, por ser um grande companheiro de trabalho, participando dos sucessos e falhas ao longo do mestrado, dando dicas e orientações que por vezes se fizeram essenciais em determinadas etapas do projeto. Agradeço também por ser o grande incentivador de viagens e novas ideias, e por me incentivar sempre que as coisas pareciam que não iam dar certo. Agradeço por toda a ajuda durante o mestrado, principalmente quando se tratava da operação da prensa para realizar a lise de bactérias. Agradeço pelos momentos de descontração dentro e fora do laboratório, como disparar o alarme de incêndio de supermercado na Alemanha sem intenção, por exemplo, além de ser companheiro de corridas de kart (um adversário que luta até a morte por sua posição), de guerras de paintball (dando cobertura em um momento e no seguinte estando do outro lado do campo, não dando suporte algum) e de conversas por vezes intelectuais e por vezes (a maioria delas) descontraídas,

Ao Eduardo Mendonça (Piá), por estar sempre de bom humor, mostrando dedicação nos trabalhos realizados no laboratório, e também por compartilhar de boas risadas dentro e fora de laboratório, além de ser um grande adversário nas corridas de kart,

Ao Lucas Pedrosa, por também, assim como o Eduardo Mendonça, estar sempre bem humorado e proporcionar boas risadas, além de mostrar grande dedicação nos trabalhos desenvolvidos no laboratório,

Ao Eduardo Constantino, por ser um grande amigo e compartilhar de boas histórias e risadas, além de trabalhar com seriedade e eficiência, me auxiliando em várias etapas do projeto. Um agradecimento especial por ter sido meu professor relâmpago de Francês, com a Dilza e com o Fernando, me auxiliando com a língua (nem que fosse apenas em duas frases) 2 dias antes de uma viagem, o que, diga-se de passagem, foi fundamental,

A Marta Olivério, por ser uma grande amiga e compartilhar de momentos de descontração dentro e fora do laboratório, além de ser muito eficiente e se mostrar dedicada, o que me incentivou a me dedicar cada dia mais aos estudos e ao trabalho desenvolvido no laboratório. Agradeço também por apreciar um

bom Rock durante as limpezas da “biomol”, onde o computador era extremamente disputado e ouvintes de Rock eram escassos na época,

A Kiane Freitas, por me auxiliar em algumas etapas, se mostrando dedicada e ouvindo minhas explicações e orientações, além de compartilhar de bons momentos de descontração dentro e fora do laboratório,

Ao João Stanke, por me auxiliar em algumas etapas, se mostrando empenhado, além de compartilhar de momentos de descontração,

A Brenda Marin, por ser oficialmente minha primeira “orientada” de iniciação científica, me auxiliando e observando meus passos, além de me trazer a responsabilidade de passar o conhecimento adquirido ao longo da vida científica,

Ao Sr. Luiz e ao Sr. Sebastião, ambos seguranças na portaria do prédio de Ciências Biológicas, sendo por muitas vezes as primeiras pessoas as quais me recebiam com um “Bom dia, tudo bem?” na universidade,

Especialmente aos meus queridos e amados pais Ivone Simões Morgon e José Marcelo Morgon, e a minha querida e amada irmãzinha mais velha (porém, sempre irmãzinha) Christiane Simões Morgon, os quais foram exemplos de vida, me mostrando o caminho do bem desde o início da minha existência. Em todos os momentos, desde os mais fáceis, até os mais difíceis da minha vida, todos foram indispensáveis para que eu seguisse em frente, com força e determinação para alcançar meus objetivos. Agradeço por terem sempre acreditado em mim. Agradeço por terem me guiado até aqui, e terem me ensinado princípios que apenas a família pode nos ensinar,

Especialmente a minha amada namorada Eleonora Paulini, por me amar, me aceitar e me fazer muito feliz. Agradeço por me apoiar nos momentos mais difíceis, por me fazer lembrar que sempre há uma luz no fim do túnel mesmo que eu não consiga enxergar, por me dizer aquele “eu te amo” quando eu menos esperava, e por me fazer uma pessoa melhor, tanto na vida profissional como pessoal, e por ser uma pessoa muito especial à qual expressei minha profunda admiração pessoal e profissional, além de meu eterno amor,

E por fim, especialmente a todos os meus mestres professores, desde o ensino pré-escolar ao ensino superior, os quais mesmo enfrentando dificuldades, estavam sempre presentes, determinados, otimistas, buscando dar o melhor de si para formar mentes que seriam um dia os pilares da sociedade. Agradeço por todos eles terem sido exemplos profissionais e exemplos de vida, o que me motivou a trilhar o caminho da educação, apesar de desvalorizado por muitos, fundamental para todos. Agradeço por meus mestres terem me influenciado de maneira positiva, e principalmente por terem me deixado o sentimento de responsabilidade para com a sociedade, possuindo a ousadia de buscar os mesmos grandes feitos por eles exercidos.

“O impossível é a barreira que a ignorância nos impõe”

(Autor desconhecido)

RESUMO

O veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* é composto por várias classes de moléculas biologicamente ativas com ação tóxica e/ou enzimática. Dentre estas toxinas, destacam-se serinoproteases, fosfolipases, hialuronidases e metaloproteases do tipo astacinas. As astacinas são enzimas secretadas e estão relacionadas a eventos envolvendo homeostase; ovulação e fertilização; embriogênese, como na morfogênese de tecidos; proliferação e migração celular; progressão do ciclo celular e apoptose; entre outros. Durante o envenenamento, o papel das metaloproteases no local da picada deve estar relacionado com a degradação de componentes da Matriz Extracelular, sendo então consideradas possíveis fatores de espalhamento. Por meio de estudos envolvendo biologia molecular foi possível caracterizar três isoformas de proteínas do tipo astacinas no veneno de *Loxosceles intermedia*, determinadas LALP1, LALP2 e LALP3. Destas, apenas a LALP1 clonada e obtida através de expressão heteróloga. Foi demonstrado que a LALP1 possui atividade sobre moléculas de matriz extracelular, como gelatina, fibrinogênio e fibronectina. Ainda, dados recentes demonstraram que as proteases do tipo astacinas constituem uma família de genes em aranhas do gênero *Loxosceles* e que novas isoformas podem ser encontradas. Por conseguinte, o objetivo deste trabalho foi efetuar a clonagem e expressão heteróloga de uma nova isoforma de metaloprotease presente no veneno de *L. intermedia* por meio de técnicas de biologia molecular, visando ainda possibilidades futuras de estudos estruturais e funcionais desta enzima. A predição da estrutura tridimensional da LALP3 revelou que a proteína possui aspectos estruturais característicos das astacinas, os quais são relevantes para a atividade destas enzimas. Os resultados obtidos da clonagem e expressão da LALP3 em vetor pET20b+ mostraram que a utilização de diferentes condições de temperatura, concentração de indutor e meio de cultura não permitiram a obtenção da proteína recombinante na condição solúvel. Desta forma, foi realizada a clonagem e expressão da LALP3 em vetor pET-SUMO, o qual permite a adição da etiqueta de solubilidade SUMO à proteína de interesse. Dentre as condições avaliadas foi verificado que as expressões utilizando as cepas de *E. coli* SHuffle T7 Express LysY e BL21 STAR (DE3) One Shot resultaram na proteína recombinante na condição solúvel. Após a purificação da LALP3 obtida na cepa SHuffle T7 Express LysY foram realizados testes de atividade, os quais mostraram que a LALP3 obtida não apresentou atividade sobre moléculas de fibrinogênio, azocaseína e colágeno tipo I desnaturado (gelatina). Como conclusão tem-se que os passos de purificação devem ser refinados para livrar a amostra de contaminantes e que outras estratégias podem ser utilizadas, como técnicas de *refolding* mais elaboradas e o emprego de sistemas de expressão utilizando organismos eucarióticos.

Palavras-chave: metaloproteases, astacinas, *Loxosceles intermedia*

ABSTRACT

The venom from spiders of *Loxosceles* genus composed of several classes of biologically active molecules with toxic or enzymatic action. Among these toxins serinoproteases, phospholipases, hyaluronidases and astacin-like metalloproteases stand out. Astacins are secreted enzymes and are associated to events involving homeostasis; ovulation and fertilization; embryogenesis, as in tissue morphogenesis; cell migration and proliferation; cell cycle progression and apoptosis; among others. During envenomation, the role of the metalloproteases on the bite site is probably related to Extracellular Matrix degradation, being considered possible spreading factors. Through molecular biology studies it was possible to characterize three isoforms of astacin-like metalloproteases from *Loxosceles intermedia*, named LALP1, LALP2 and LALP3. From these, only LALP1 was cloned and obtained through heterologous expression. It was demonstrated that LALP1 is able to degrade extracellular matrix components, such gelatin, fibrinogen and fibronectin. Also, recent data showed that astacin-like proteases constitute a family of genes in spiders of *Loxosceles* genus and new isoforms are likely to be found. Therefore, the objective of this work was to carry out the cloning and heterologous expression of a new isoform of metalloprotease present in *L. intermedia* venom through molecular biology techniques, aiming for future possibilities of structural and functional studies of this protein. The three dimensional structure prediction of LALP3 revealed that the protein has structural aspects characteristic of astacins, which are important for the activity of such enzymes. The results obtained from the cloning and expression of LALP3 in pET20b+ vector depicted that different conditions of temperature, inductor concentration and culture medium did not yield the soluble protein. Therefore, the cloning and expression of LALP3 in pET-SUMO vector, which allows the addition of the solubility tag SUMO, were carried out. Among the conditions evaluated it was verified that the expressions using the *E. coli* strains SHuffle T7 Express LysY and BL21 STAR (DE3) One Shot yielded the soluble protein. After the purification of LALP3 obtained using the strain SHuffle T7 Express LysY activity tests were performed, which showed that LALP3 was not able to hydrolyze fibrinogen, azocasein and type I denatured collagen (gelatin) molecules. In conclusion it is stated that purification steps must be refined in order to free the sample from contaminants and other strategies can be used, as elaborated refolding techniques and the employment of expression systems using eukaryotic organisms.

Key-words: metalloproteases, astacins, *Loxosceles intermedia*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ARANHAS DA ESPÉCIE <i>Loxosceles intermedia</i> REPRESENTANDO O GÊNERO <i>Loxosceles</i>	26
FIGURA 2 – ESPÉCIES DE ARANHAS DO GÊNERO <i>Loxosceles</i> DE MAIOR IMPORTÂNCIA MÉDICA NO PARANÁ.....	28
FIGURA 3 – LESÃO DERMONECRÓTICA RESULTANTE DE ACIDENTE COM ARANHA DO GÊNERO <i>Loxosceles</i>	30
FIGURA 4 – CARACTERÍSTICAS DO VENENO E GLÂNDULA PRODUTORA DE VENENO DE <i>Loxosceles intermedia</i>	34
FIGURA 5 – TRANSCRIPTOMA DA GLÂNDULA DE VENENO DE <i>Loxosceles intermedia</i>	35
FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DAS SEQUENCIAS NUCLEOTÍDICA E AMINOACÍDICA PREDITA DA LALP1.....	39
FIGURA 7 – CLASSIFICAÇÃO DAS METALOPROTEASES DE ACORDO COM A ESTRUTURA DO SÍTIO CATALÍTICO.....	41
FIGURA 8 – MOTIVOS ESTRUTURAIS CARACTERÍSTICOS DA FAMÍLIA DAS ASTACINAS.....	42
FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO DO DOMÍNIO CATALÍTICO DA ASTACINA DE <i>Astacus astacus</i>	44
FIGURA 10 – PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LALP3.....	70
FIGURA 11 – PREDIÇÃO DA ESTRUTURA DO SÍTIO CATALÍTICO DA LALP3.....	71
FIGURA 12 – SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA E DEDUÇÃO DA SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA DA LALP3.....	72
FIGURA 13 – RESULTADO DA PCR DE COLÔNIAS (LALP3/PGEM-T) ANALISADO EM GEL DE AGAROSE 1,5%.....	74
FIGURA 14 – RESULTADO DA PCR DE COLÔNIAS (LALP3/PET20B+) ANALISADO EM GEL DE AGAROSE 1,5%.....	76
FIGURA 15 – ANÁLISE DAS TRÊS POSSÍVEIS FASES DE LEITURA DA CONTRUÇÃO LALP3 MADURA EM PET20B+.....	77

FIGURA 16 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/PET20B+ EM MEIO LB LÍQUIDO A 30°C UTILIZANDO A CEPA SHUFFLE T7 EXPRESS LYSY.....	78
FIGURA 17 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/PET20B+ EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 30°C UTILIZANDO A CEPA SHUFFLE T7 EXPRESS LYSY.....	81
FIGURA 18 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/PET20B+ EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 20°C UTILIZANDO A CEPA SHUFFLE T7 EXPRESS LYSY.....	83
FIGURA 19 – RESULTADO DA REAÇÃO DE PCR DE COLÔNIAS (LALP3/PET-SUMO) ANALISADO EM GEL DE AGAROSE 1,5%.....	86
FIGURA 20 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/SUMO EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 30°C UTILIZANDO A CEPA SHUFFLE T7 EXPRESS LYSY.....	88
FIGURA 21 – ANÁLISE POR <i>WESTERN BLOTTING</i> DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/SUMO EXPRESSA EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 30°C UTILIZANDO A CEPA SHUFFLE T7 EXPRESS LYSY.....	91
FIGURA 22 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/SUMO EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 20°C UTILIZANDO A CEPA SHUFFLE T7 EXPRESS LYSY.....	93

FIGURA 23 – ANÁLISE POR <i>WESTERN BLOTTING</i> DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/SUMO EXPRESSA EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 20°C UTILIZANDO A CEPA SHUFFLE T7 EXPRESS LYSY.....	94
FIGURA 24 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/SUMO EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 30°C UTILIZANDO A CEPA BL21 (DE3) PLYSS.....	96
FIGURA 25 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/SUMO EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 30°C UTILIZANDO A CEPA BL21 STAR (DE3) ONE SHOT.....	99
FIGURA 26 – ANÁLISE POR <i>WESTERN BLOTTING</i> DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/SUMO EXPRESSA EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 30°C UTILIZANDO A CEPA BL21 (DE3) PLYSS.....	102
FIGURA 27 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/SUMO EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 20°C UTILIZANDO A CEPA BL21 STAR (DE3) ONE SHOT.....	104
FIGURA 28 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DA EXPRESSÃO DA LALP3/SUMO EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 30°C UTILIZANDO A CEPA SHUFFLE T7 EXPRESS LYSY.....	107
FIGURA 29 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DA EXPRESSÃO DA LALP3/SUMO EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 30°C UTILIZANDO A CEPA BL21 STAR (DE3) ONE SHOT.....	109
FIGURA 30 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DA PURIFICAÇÃO DA LALP3/SUMO APÓS EXPRESSÃO EM SHUFFLE T7 EXPRESS LYSY.....	111

FIGURA 31 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DA PURIFICAÇÃO DA LALP3/SUMO APÓS EXPRESSÃO EM BL21 STAR (DE3) ONE SHOT.....	112
FIGURA 32 – ANÁLISE POR <i>WESTERN BLOTTING</i> DA LALP3/SUMO APÓS PURIFICAÇÃO EM RESINA NI-NTA AGAROSE.....	113
FIGURA 33 – AVALIAÇÃO DO EFEITO FIBRINOGENOLÍTICO DA LALP3/SUMO.....	116
FIGURA 34 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DA LALP3/SUMO SOBRE COLÁGENO TIPO I DESNATURADO.....	117
FIGURA 35 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA LALP3/SUMO EM DIFERENTES RAZÕES DE ENZIMA:SUBSTRATO.....	119
FIGURA 36 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DA EXPRESSÃO DA LALP3/SUMO EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 37°C UTILIZANDO A CEPA BL21 STAR (DE3) ONE SHOT.....	121
FIGURA 37 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DA PURIFICAÇÃO DESNATURANTE DA LALP3/SUMO APÓS EXPRESSÃO EM BL21 STAR (DE3) ONE SHOT.....	123

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Loxosceles</i> OCORRENTES NO BRASIL E PARANÁ.....	27
TABELA 2 – CONDIÇÕES DE MINI-EXPRESSÃO DA LALP3 MADURA.....	114
TABELA 3 – CONDIÇÕES DE EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA DA LALP3 MADURA.....	114

LISTA DE SIGLAS

APS: Persulfato de amônio

BCIP: 5-bromo-4cloro-3-indoil fosfato

BMP-1: proteína morfogenética de osso - 1

BOD: Demanda biológica de oxigênio

BSA : Albumina de soro bovina (“Bovine Serum Albumin”)

cDNA: DNA complementar

dNTPs: mistura de nucleotídeo trifosfato (A, T, G, C)

DTT: Ditionitrito

Expasy: o inglês, “Expert Protein Analysis System

IgG: Imunoglobulina G

IPTG: isopropil- β -D-tiogalatopiranosídeo

IRA: Insuficiência renal aguda

LALP: do inglês, *Loxosceles astacin-like* protease

LAST: do inglês, *Limulus astacin*

LB: Luria-Bertani

NBT: do inglês, *nitro blue tetrazolium*

Ni-NTA: Níquel-ácido nitrilotriacético

PBS: Solução salina tamponada com fosfato (*phosphate buffer saline*)

PCR: reação em cadeia da polimerase

rpm: rotações por minuto

SDS: dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (*sodium dodecyl sulfate-poliacrilamide gel electrophoresis*)

TEMED: N,N,N',N'- tetrametil-etilenodiamina

v/v: proporção volume/volume

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	20
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 Aranhas.....	24
2.2 Aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> (Sicariidae).....	24
2.3 Distribuição Geográfica	26
2.4 Loxoscelismo	28
2.4.1 Loxoscelismo cutâneo ou dermonecrótico	29
2.4.2 Loxoscelismo sistêmico ou viscerocutâneo	30
2.5 Tratamento	31
2.6 Veneno de aranhas do gênero <i>Loxosceles</i>	33
2.6.1 Metaloproteases do veneno loxoscélico	36
2.7 Metaloproteases dependentes de zinco	40
2.7.1 Metaloproteases da família das astacinas.....	42
2.8 Potencial biotecnológico das metaloproteases do tipo astacina do veneno de aranhas do gênero <i>Loxosceles</i>	45
2.9 Metaloproteases do tipo astacina recombinantes	46
3.0 OBJETIVOS.....	48
3.1 Objetivo geral.....	48
3.2 Objetivos específicos	48
4.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1 Espécimes de aranha-marrom <i>Loxosceles intermedia</i>	49
4.2 Predição das estruturas tridimensionais da LALP3	49
4.3 Obtenção do inserto por PCR com Pfu DNA polimerase	49
4.4 Extração dos fragmentos do gel de Agarose	50
4.5 Adenilação do Inserto para ligação em vetor de clonagem pGEM-T.....	50
4.6 Extração do inserto adenilado do gel de agarose	50
4.7 Reação de Ligação em vetor pGEM-T.....	51
4.8 Transformação bacteriana por eletroporação.....	51
4.9 Plaqueamento das bactérias transformadas	51
4.10 PCR de colônia.....	52
4.11 Pré-inóculo para processamento de sequenciamento.....	53
4.12 PCR de sequenciamento, precipitação e análise de sequenciamento	53
4.13 Subclonagem da sequência de LALP3 madura em vetor de expressão pET20b+	54
4.14 Subclonagem da sequência de LALP3 madura em vetor de expressão Champion pET-SUMO	54

4.16 Testes de mini-expressão da construção LALP3/pET20b+	56
4.17 Testes de mini-expressão da construção LALP3/SUMO	58
4.18 Expressão em larga escala da construção LALP3/SUMO em cepa <i>E. coli</i> SHuffle T7 Express LysY	60
4.19 Expressão em larga escala da construção LALP3/SUMO em cepa <i>E. coli</i> BL21 STAR (DE3) One Shot	61
4.20 Análise dos testes de mini-expressão e das expressões em larga escala por eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida.....	62
4.21 Imunoensaios de <i>Western Blotting</i>	62
4.22 Purificação da proteína recombinante LALP3/SUMO	63
4.23 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford.....	65
4.24 Avaliação da atividade fibrinogenolítica da LALP3/SUMO expressa em SHuffle T7 Express LysY	65
4.25 Ensaio de atividade da LALP3/SUMO sobre azocaseína cromogênica	66
4.26 Ensaio de atividade da LALP3/SUMO sobre colágeno tipo I desnaturado	67
5.0 RESULTADOS	69
5.1 Predição da estrutura tridimensional da LALP3 madura	69
5.1 Clonagem da sequência da LALP3 madura em vetor de clonagem pGEM-T	72
5.2 Subclonagem da sequência da LALP3 madura em vetor de expressão pET20b+	75
5.3 Padronização das condições de expressão ideais da LALP3/pET20b+	77
5.4 Subclonagem da sequência da LALP3 madura em vetor de expressão Champion pET-SUMO	85
5.5 Padronização das condições de expressão ideais da LALP3/SUMO em <i>E. coli</i> SHuffle T7 Express LysY	86
5.6 Padronização das condições de expressão ideais da LALP3/SUMO em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS e BL21 STAR (DE3) One Shot.....	94
5.7 Expressão da LALP3/SUMO em <i>E. coli</i> SHuffle T7 Express LysY em larga escala a 30°C.	105
5.8 Expressão da LALP3 madura /SUMO em <i>E. coli</i> BL21 STAR (DE3) One Shot em larga escala a 30°C.....	107
5.9 Purificação da LALP3/SUMO por cromatografia de afinidade com resina de Ni-NTA agarose em condições nativas	109
5.10 Avaliação da atividade fibrinogenolítica da LALP3/SUMO obtida em SHuffle T7 Express LysY	115
5.11 Avaliação da atividade da LALP3/SUMO obtida em SHuffle T7 Express LysY sobre colágeno tipo I desnaturado	116
5.12 Avaliação da atividade da LALP3/SUMO obtida em SHuffle T7 Express LysY sobre a azocaseína	118
5.13 Expressão da LALP3/SUMO em <i>E. coli</i> BL21 STAR (DE3) One Shot em larga escala a 37°C.....	120
5.14 Purificação da LALP3/SUMO por cromatografia de afinidade com resina de Ni-NTA agarose em condições desnaturantes.....	121

6.0 DISCUSSÃO.....	124
7.0 CONCLUSÃO.....	134
8.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	135
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136

1.0 INTRODUÇÃO

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família Sicariidae, subordem Aranemorphae, ordem Araneae, classe Aracnida, subfilo Chelicerata e filo Arthropoda (RUPPERT *et al.*, 2005). Atualmente esta família é constituída de mais de 120 espécies descritas (PLATNICK, 2013). No Brasil a ocorrência de espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* é ampla, de modo que até a presente data foram identificadas 12 espécies diferentes (GONCALVES-DE-ANDRADE *et al.*, 2012). Dentre estas espécies, 4 podem ser encontradas no Estado do Paraná (MARQUES-DA-SILVA e FISCHER, 2005), sendo que as espécies *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho* e *Loxosceles laeta* possuem maior importância médica por apresentarem maior frequência em acidentes com humanos. Somente no Estado do Paraná foram registrados mais de 2600 casos de acidentes envolvendo aranhas de gênero *Loxosceles* em 2012, sendo que este número representa mais de 50% dos casos registrados em todo o Brasil no mesmo período (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO – SINAN, 2013).

Estas aranhas são animais de pequeno porte e popularmente conhecidas como aranhas-marrons, devido à coloração que varia de marrom-claro a marrom-escuro. Além disso, também são conhecidas como aranhas-violino, uma vez que apresentam uma marca com o formato de um violino na região dorsal do cefalotórax. Outra característica das aranhas do gênero *Loxosceles* é a posição e número de olhos, dispostos em três díades formando um semicírculo (HOGAN *et al.*, 2004; DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992). Estes animais são bem adaptados às condições intradomiciliares, o que favorece a ocorrência de acidentes com humanos. Estas aranhas podem se instalar atrás de quadros, dentro da mobília, roupas e sapatos (FISCHER e VASCONCELLOS-NETO, 2005; GONCALVES-DE-ANDRADE e TAMBOURGI, 2003). Por sua vez, a maioria dos acidentes ocorre quando as aranhas são comprimidas contra o corpo no ato de vestir-se, calçar-se, enxugar-se ou durante o sono (FUTRELL, 1992; VETTER e ISBISTER, 2008; ISBISTER e FAN, 2011).

O termo loxoscelismo é empregado para caracterizar o conjunto de manifestações clínicas decorrentes do envenenamento induzido pela picada de espécies do gênero *Loxosceles*. Pode-se apresentar em dois quadros que podem ocorrer concomitantemente ou não, denominados loxoscelismo cutâneo e loxoscelismo sistêmico (DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992). O loxoscelismo cutâneo é o quadro clínico relacionado ao local da picada, incluindo sinais e sintomas como: eritema, edema, isquemia do tecido local, hemorragia e lesão dermonecroticas com espalhamento gravitacional, além da formação da placa marmórea, caracterizada por uma área de tecido isquêmico circundada por um halo vermelho e zonas pálidas (FUTRELL, 1992; ISBISTER e FAN, 2011; CHATZAKI *et al.*, 2012). O loxoscelismo sistêmico é comumente relacionado a casos mais severos, porém ocorre com menor frequência se comparado ao loxoscelismo cutâneo. O sintoma característico do loxoscelismo sistêmico é a anemia hemolítica intravascular. Também podem ser observadas alterações no quadro hemolítico como coagulação intravascular disseminada e trombocitopenia decorrente da agregação plaquetária, além de outros distúrbios como a redução do hematócrito, aumento de bilirrubina indireta, icterícia, hemoglobinúria e insuficiência renal aguda (IRA) (DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992; CHAIM *et al.*, 2006).

Estudos realizados com o veneno loxoscélico demonstraram que o mesmo é um composto cristalino constituído por enzimas, peptídeos e nucleotídeos, sendo produzido por um par de glândulas localizado no cefalotórax do animal (DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992; APPEL *et al.*, 2005). O perfil proteico do veneno apresenta predominantemente moléculas de baixa massa molecular (1-45 kDa) (DA SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005; DA SILVEIRA *et al.*, 2002). Dentre elas podem ser citadas hialuronidases, fosfolipases-D, serinoproteases, metaloproteases, e toxinas inseticidas, sendo que as fosfolipases-D são as enzimas do veneno melhor caracterizadas até então (CHAIM *et al.*, 2011a; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008).

Em relação às metaloproteases do veneno de *Loxosceles intermedia*, foram identificadas duas enzimas: a Loxolisina A, com atividade fibronectinolítica, fibrinogenolítica; e a Loxolisina B, com atividade gelatinolítica (FEITOSA *et al.*, 1998). Além de moléculas de fibrinogênio e fibronectina, estas enzimas também possuem como substrato moléculas de entactina e o núcleo

proteico de moléculas de heparan sulfato, componentes estruturais de membranas basais. Por conseguinte, acredita-se que a ação destas metaloproteases resulta em hemorragia e insuficiência renal após o envenenamento, além de agirem como fatores de espalhamento para outras toxinas (VEIGA *et al.*, 2000a).

Estudos posteriores revelaram que as metaloproteases do veneno de *L. intermedia* pertencem à família das astacinas, uma vez que elas apresentam os motivos estruturais característicos que definem a família – o motivo de ligação ao zinco (HEXXHXXGXXHE – onde “X” representa qualquer aminoácido) e a volta de metionina (SXMHY) (BODE *et al.*, 1993; DA SILVEIRA *et al.*, 2007a). Proteases desta família estão associadas à degradação de componentes da matriz extracelular. Elas atuam em processos como embriogênese, homeostase, morfogênese de tecidos, ovulação e fertilização, proliferação e migração celular, progressão do ciclo celular e apoptose, artrite e câncer (HOOPER, 1994; LOPEZ-OTIN e OVERALL, 2002).

A primeira metaloprotease do tipo astacina presente no veneno de *L. intermedia* foi identificada a partir de estudos utilizando uma biblioteca de cDNA, pela qual foi realizada a clonagem e expressão heteróloga da LALP1 (*Loxosceles Astacin-Like Protease*). Esta metaloprotease hidrolisa moléculas de fibrinogênio, fibronectina e também gelatina. Ensaio com células subentodeliais de coelho *in vitro* também demonstraram que a LALP1 promove alterações morfológicas e perda de adesão ao substrato. É importante ressaltar que além de ter sido o primeiro membro da família das astacinas descrita no veneno de *L. intermedia*, esta enzima também foi a primeira metaloprotease do tipo astacina identificada em venenos animais (DA SILVEIRA *et al.*, 2007a).

Estudos recentes demonstraram que proteínas do tipo astacina constituem uma família gênica em aranhas do gênero *Loxosceles*. Além da LALP1, foram identificadas e clonadas duas novas isoformas presentes no veneno de *Loxosceles intermedia*, denominadas LALP2 e LALP3, e identificada pelo menos uma isoforma nos venenos de *Loxosceles laeta* (LALP4) e *Loxosceles gaucho* (LALP5) (TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010). Além disso, o transcriptoma da glândula produtora de veneno de *Loxosceles intermedia* identificou transcritos que codificam para várias isoformas de LALPs e acredita-

se que outras isoformas estejam presentes no veneno de *L. intermedia* (GREMSKI et al., 2010).

Mesmo com a escassez de dados sobre as metaloproteases do tipo astacina de aranhas do gênero *Loxosceles*, acredita-se que estas enzimas possuam ampla aplicação biotecnológica. Algumas destas aplicações podem incluir o uso destas enzimas em estudos envolvendo processos como diferenciação celular, tumorigênese e metástase, resposta inflamatória e permeabilidade vascular. Além disso, acredita-se que as metaloproteases do veneno de aranhas-marrons podem ser utilizadas como agentes trombolíticos e também no desenvolvimento de inibidores metaloproteases da família das astacinas (CHAIM et al., 2011a; SENFF-RIBEIRO et al., 2008).

Por sua vez, este trabalho compreende a clonagem, expressão heteróloga e avaliação da atividade da LALP3, tendo em vista a escassez de dados e o potencial biotecnológico das proteínas do tipo astacina do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*.

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aranhas

As aranhas estão taxonomicamente classificadas como pertencentes ao filo Arthropoda, classe Arachnida e ordem Araneae, sendo a última constituída de mais de 43000 espécies agrupadas em aproximadamente 3900 gêneros (PLATNICK, 2013). Apesar da grande diversidade, as aranhas são divididas em dois grupos segundo a posição de suas quelíceras: Ortognata ou Megalomorfa e Labidognata ou Araneomorfa (RUPPERT *et al.*, 2005; ESCOUBAS *et al.*, 2000). São animais que possuem o corpo dividido em cefalotórax e abdômen, com tamanhos variando entre 0.5 mm a 9 cm de comprimento. Geralmente estes aracnídeos são predadores e sua presa pode ser capturada em teias ou de forma ativa (RUPPERT *et al.*, 2005). Distribuídas globalmente, aranhas de apenas dois gêneros estão associadas a acidentes com humanos de importância médica: as viúvas-negras (*Latrodectus*) e as aranhas-marrons ou aranhas-reclusa (*Loxosceles*) (VETTER e ISBISTER, 2008; ESCOUBAS *et al.*, 2000). De maneira semelhante, as aranhas australianas teia-de-funil (*Atrax* e *Hadronyche*) e os ctenídeos brasileiros, também conhecidos como aranhas-armadeiras (*Phoneutria*) também estão associadas a acidentes com humanos, contudo, sua distribuição é limitada a determinadas regiões (ESCOUBAS *et al.*, 2000; ISBISTER *et al.*, 2005; BUCARETCHI *et al.*, 2000; BUCARETCHI *et al.*, 2008).

2.2 Aranhas do gênero *Loxosceles* (Sicariidae)

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família Sicariidae, subordem Aranomorphae, ordem Araneae, classe Arachnida, subfilo Chelicerata e filo Arthropoda (RUPPERT *et al.*, 2005). Estas aranhas são conhecidas popularmente como aranhas-marrons ou aranhas-violino, devido à coloração e à presença de uma marca com um formato de um violino na região dorsal de seu cefalotórax. Apesar de não ser sempre visível, a marca com o formato de violino é uma das formas de identificação destas aranhas. Outra característica

determinante para a identificação deste gênero é disposição e número de olhos, sendo 6 olhos separados em 3 díades formando um semicírculo (HOGAN *et al.*, 2004; DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992; VETTER e VISSCHER, 1998; SWANSON e VETTER, 2006; SAUPE *et al.*, 2011) (Figura 1).

Em relação à morfologia, são aranhas de pequeno porte, apresentam comprimento corporal variando de 8 – 15mm e pernas finas com comprimento de 30 a 50mm. Possuem coloração característica variando de marrom claro a marrom escuro. São animais que possuem dimorfismo sexual, sendo que a fêmea tem corpo maior e possui pernas mais curtas, e o macho tem corpo menor e pernas mais longas. Além disso, os machos apresentam os palpos com tarsos modificados denominados pedipalpos, estruturas especializadas na transferência dos espermatozoides (GILBERT, 1997). Elas podem viver em média de 3 a 7 anos e suportam condições extremas, como a falta de alimento e água, e temperaturas que variam entre 8°C a 43°C (DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992; FISCHER e VASCONCELLOS-NETO, 2005). As aranhas do gênero *Loxosceles* geralmente se alimentam de presas vivas, contudo, foi verificado que a espécie *Loxosceles reclusa* possui preferência por presas já mortas (DA SILVA *et al.*, 2004; SANDIDGE, 2003). Acredita-se que a função primária do veneno destes animais é paralisar e matar as presas, bem como iniciar a digestão das mesmas. Apesar de se enquadrarem em um dos gêneros que estão envolvidas em acidentes com humanos, as aranhas-marrons não possuem comportamento agressivo e picam somente para se defender, sendo que a maioria dos acidentes ocorre quando comprimidas no corpo no ato de vestir-se, calçar-se, enxugar-se ou durante o sono (FUTRELL, 1992; VETTER e ISBISTER, 2008; ISBISTER e FAN, 2011; RASH e HODGSON, 2002).

São animais sedentários, com hábitos noturnos e preferem lugares escuros (DA SILVA *et al.*, 2004; MALAQUE *et al.*, 2002). Em seu habitat natural, estas aranhas se encontram dentro de fendas, sob pedras, troncos de árvores e restos de vegetais. Contudo, são animais muito bem adaptados às condições intradomiciliares, desta forma favorecendo a ocorrência de acidentes com os humanos, uma vez que as aranhas-marrons podem se instalar atrás de quadros, dentro da mobília, roupas e sapatos, onde não há contato direto com

a luz (FISCHER e VASCONCELLOS-NETO, 2005; GONCALVES-DE-ANDRADE e TAMBOURGI, 2003).

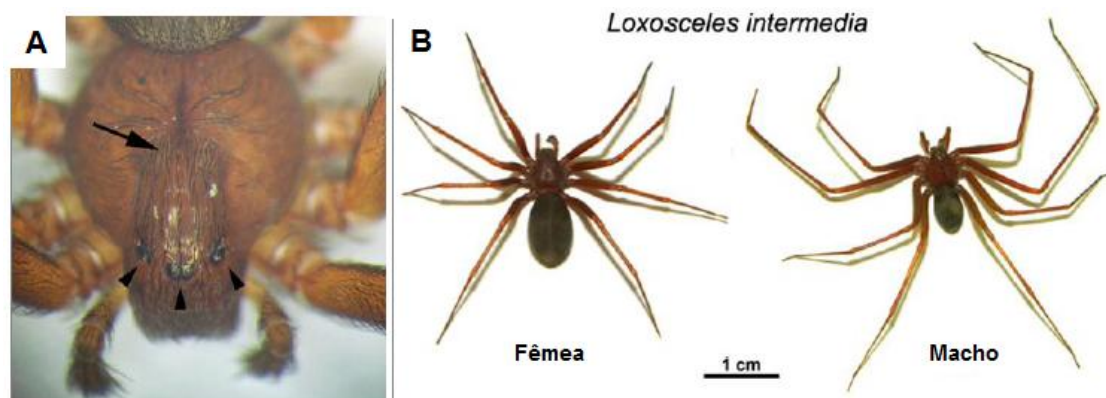


FIGURA 1 – ARANHAS DA ESPÉCIE *Loxosceles intermedia* REPRESENTANDO O GÊNERO *Loxosceles*. (A) Marca semelhante à um violino no cefalotórax (seta); disposição dos olhos agrupados em 3 díades formando um semicírculo em forma de “U” no cefalotórax (pontas de seta). (B) Representação do dimorfismo sexual de aranhas da espécie *Loxosceles intermedia*. Adaptado de Chaim et al., 2011a.

2.3 Distribuição Geográfica

As aranhas do gênero *Loxosceles* são cosmopolitas e podem ser encontradas na África, Ásia, Américas, Europa e Austrália (PLATNICK, 2013; DA SILVA *et al.*, 2004; BINFORD *et al.*, 2008). Atualmente este gênero é constituído de mais de 120 espécies descritas (PLATNICK, 2013), e dentre elas 20 são endêmicas do continente Africano, 50 da América do Norte e Central e 30 da América do Sul (MARQUES-DA-SILVA e FISCHER, 2005).

Até a presente data foram descritas 12 espécies de aranhas desse gênero no Brasil (GONCALVES-DE-ANDRADE *et al.*, 2012), sendo que 4 delas podem ser encontradas no estado do Paraná (MARQUES-DA-SILVA e FISCHER, 2005). As espécies ocorrentes no Brasil e no Paraná estão representadas na Tabela 1.

TABELA 1 – ESPÉCIES DO GÊNERO *Loxosceles* OCORRENTES NO BRASIL E PARANÁ

Espécies de aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> ocorrentes no Brasil
<i>Loxosceles adalaidae</i>
<i>Loxosceles anomala</i>
<i>Loxosceles similis</i>
<i>Loxosceles amazonica</i>
<i>Loxosceles gaucho</i> *
<i>Loxosceles intermedia</i> *
<i>Loxosceles laeta</i> *
<i>Loxosceles hirsuta</i> *
<i>Loxosceles porta</i>
<i>Loxosceles imodesta</i>
<i>Loxosceles chapadensis</i>
<i>Loxosceles niedeguidonae</i>

* Espécies encontradas no Paraná.

As espécies de maior importância médica nas Américas variam, sendo que na América do Sul a *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta* são as maiores responsáveis por acidentes loxoscélicos com humanos (Figura 2). Já na América do Norte, constata-se que a maior incidência de acidentes com aranhas deste gênero envolve as espécies *L. deserta* e *L. reclusa* (BARBARO *et al.*, 2005). No Paraná a espécie predominante é a *Loxosceles intermedia*, sendo que no município de Curitiba é também a principal espécie envolvida em acidentes com humanos (MARQUES-DA-SILVA e FISCHER, 2005).



FIGURA 2 – ESPÉCIES DE ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles* DE MAIOR IMPORTÂNCIA MÉDICA NO PARANÁ. Adaptado de Trevisan-Silva, 2010.

2.4 Loxoscelismo

A picada das aranhas-marrons é indolor (em alguns casos a dor é semelhante à sensação causada pela perfuração com uma ponta de alfinete) e após cerca de 2 a 8 horas após a picada, a dor pode variar de leve a severa e é relatada como “queimação” no local (FUTRELL, 1992; MADSEN e EL FAR, 2010).

O termo loxoscelismo é empregado para caracterizar manifestações clínicas decorrentes do envenenamento através da picada de espécies de *Loxosceles*, o qual pode se apresentar em dois quadros: loxoscelismo cutâneo e loxoscelismo sistêmico, também conhecido como loxoscelismo vicerocutâneo ou loxoscelismo cutâneo-hemolítico (DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992).

A gravidade e a progressão das manifestações clínicas causadas pelo envenenamento dependem de fatores como: a quantidade de veneno injetada (FUTRELL, 1992; MCGLASSON *et al.*, 2007), a região onde ocorreu a picada e a condição do acidentado (BARBARO *et al.*, 1994). Além disso, a espécie, o sexo e o estágio de desenvolvimento da aranha também influenciam nas

manifestações clínicas decorrentes da picada (CHATZAKI *et al.*, 2012; DE OLIVEIRA *et al.*, 2005; MALAQUE *et al.*, 2011).

No ano de 2012, aproximadamente 4.800 casos de loxoscelismo foram registrados no Brasil, sendo que no Paraná – estado com o maior número - foram registrados cerca de 2.650 casos (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO – SINAN, 2013). A maior ocorrência de acidentes com estas aranhas se dá nos meses mais quentes do ano, principalmente no verão, onde se verifica maior atividade destes animais (DA SILVA *et al.*, 2004; VETTER, 2011).

2.4.1 Loxoscelismo cutâneo ou dermonecrótico

O loxoscelismo cutâneo é o quadro clínico mais leve e que apresenta predominância na maioria dos casos (84 a 97%). Os sinais e sintomas iniciais após a picada são dor leve e eritema, sendo que ao longo do desenvolvimento da lesão, poucas horas após a picada, observam-se sintomas como edema, isquemia do tecido local, hemorragia e lesões dermonecróticas com espalhamento gravitacional, além da formação da placa marmórea, uma área de tecido isquêmico circundada por um halo vermelho e zonas pálidas (FUTRELL, 1992; ISBISTER e FAN, 2011; CHATZAKI *et al.*, 2012) (Figura 3A).

Evidências de necrose se dão geralmente após 72 horas após o envenenamento, sendo que na ausência de tratamento, após cerca de 5 a 7 dias, a lesão evolui para uma ferida rígida e seca com bordas bem delimitadas, resultando na formação de uma escara de difícil cicatrização ao longo do tempo (DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992; ISBISTER e FAN, 2011; APPEL *et al.*, 2005; CHAIM *et al.*, 2011a; SCHENONE *et al.*, 1989). Como resultado, após 2 a 3 semanas, a formação de úlceras crônicas e destruição do tecido onde ocorreu a inoculação inicial do veneno podem ocorrer (Figura 3B), com possibilidade de levar meses para haver a restauração do epitélio ou ainda ser necessária a intervenção cirúrgica (DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992).

Além disso, o loxoscelismo cutâneo está associado a sintomas não sistêmicos como dores de cabeça, náusea, vômito, prurido e febre nas

primeiras 24 – 48 horas após o acidente (DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992; WASSERMAN e ANDERSON, 1983; SAMS *et al.*, 2001).

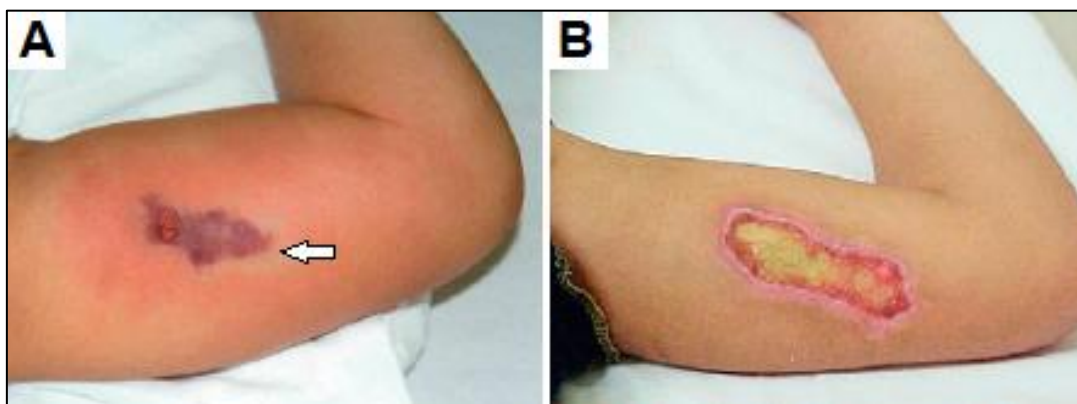


FIGURA 3 – LESÃO DERMONECRÓTICA RESULTANTE DE ACIDENTE COM ARANHA DO GÊNERO *Loxosceles*. (A) Lesão formada 24 horas após a picada, evidenciando eritema, edema e placa marmórea (seta). (B) Úlcera formada 25 dias após a picada, evidenciando a necrose do tecido no local do acidente. Adaptado de Isbister e Fan, 2011.

Postula-se ainda que esta lesão possa ser acentuada devido à presença do bacilo gram positivo *Clostridium perfringens*, presente nas quelíceras das aranhas-marrons, o qual pode ser introduzido no local do acidente juntamente com o veneno no ato da picada (MONTEIRO *et al.*, 2002).

Em condições experimentais, análises histopatológicas demonstraram uma intensa acumulação de células inflamatórias com a massiva diapedese de neutrófilos, deposição de fibrina nos vasos sanguíneos danificados, trombose, hemorragia e desorganização nas fibras de colágeno (OSPEDAL *et al.*, 2002; CHAIM *et al.*, 2011b).

2.4.2 Loxoscelismo sistêmico ou viscerocutâneo

O loxoscelismo sistêmico é observado nos casos mais severos, porém, em menor frequência se comparado ao loxoscelismo cutâneo. Ainda, os registros de pacientes que desenvolveram o loxoscelismo sistêmico variam de acordo com a espécie envolvida no acidente. Os casos mais frequentes onde pacientes desenvolveram lesões sistêmicas ocorreram após acidentes com aranhas da espécie *Loxosceles laeta* (SCHENONE *et al.*, 1989; SEZERINO *et al.*, 1998), sendo que este tipo de lesão ocorre com menos frequência em acidentes com aranhas das espécies *Loxosceles gaucho* (MALAQUE *et al.*,

2002) e *Loxosceles reclusa* (WRIGHT et al., 1997; MCDADE et al., 2010; ROSEN et al., 2012). Até então não se encontram na literatura registros de casos de loxoscelismo sistêmico em pacientes que sofreram acidentes com aranhas da espécie *Loxosceles intermedia*.

O sintoma característico do loxoscelismo sistêmico é a anemia hemolítica intravascular, contudo, outros sintomas não específicos podem ser observados, como astenia, febre, episódios eméticos, alterações sensoriais, cefaleia e insônia; dentre os casos mais graves ocorrem convulsões e coma, podendo também ocorrer prurido generalizado e petéquias (FUTRELL, 1992; ISBISTER e FAN, 2011; SCHENONE et al., 1989; ROSEN et al., 2012; BRAVO et al., 1993).

Em casos ainda mais graves podem ser observadas alterações no quadro hemolítico como trombocitopenia decorrente da agregação plaquetária e coagulação intravascular disseminada, além de outros distúrbios como a redução do hematócrito, aumento de bilirrubina indireta, icterícia, hemoglobinúria e insuficiência renal aguda (IRA) (DA SILVA et al., 2004; FUTRELL, 1992; CHAIM et al., 2006). Apesar de ocorrer em menor incidência, alguns casos de loxoscelismo podem levar a óbito devido a distúrbios hematológicos e lesões renais (DA SILVA et al., 2004). Ainda, em algumas situações também são observados distúrbios vasculares nas regiões pulmonar e hepática (LUNG e MALLORY, 2000).

2.5 Tratamento

O loxoscelismo ainda não possui uma forma de tratamento bem estabelecida para o envenenamento. Além disso, o diagnóstico do loxoscelismo é prejudicado uma vez que a identificação da espécie da aranha envolvida no acidente é realizada em poucos casos, pois os pacientes não dispõem da aranha para identificação (HOGAN et al., 2004; MALAQUE et al., 2002; VETTER, 2011).

Vetter (2011) postula que erros de diagnóstico de loxoscelismo são muito comuns, sendo que na maioria dos casos o diagnóstico é baseado na avaliação clínica da lesão sem a identificação da aranha. O autor afirma que a sazonalidade pode influenciar na frequência de acidentes causados por

aranhas da espécie *Loxosceles reclusa*, uma vez que a atividade das mesmas é maior nos meses mais quentes do ano e raramente acidentes poderiam ocorrer durante o outono ou inverno.

Buscando desenvolver uma ferramenta para auxiliar no diagnóstico de loxoscelismo, foi empregado o método de ELISA utilizando anticorpos policlonais produzidos com veneno da espécie *Loxosceles reclusa*. O método foi realizado com amostras obtidas a partir de lesões de pacientes que apresentaram suspeita de loxoscelismo, sendo que nas amostras foi possível identificar proteínas do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*. No entanto a evidência da lesão dermonecrotica ainda é determinante para o diagnóstico preciso de loxoscelismo, uma vez que o método de ELISA também identifica proteínas de veneno de outros artrópodes. Além disso, o método de ELISA não permite a identificação da espécie da aranha envolvida no acidente (AKDENIZ *et al.*, 2007; GOMEZ *et al.*, 2002; STOECKER *et al.*, 2006).

Mesmo sem o diagnóstico preciso de casos de loxoscelismo, para tratar os sintomas e amenizar os efeitos dos quadros cutâneo e sistêmico são utilizados fármacos como a dapsona, um inibidor de células polimorfonucleares, o qual diminui a inflamação do tecido local; corticoides, os quais atuam como imunossupressores nas fases iniciais do loxoscelismo sistêmico; e antibióticos, visando a prevenção de infecções no local da ferida e possível infecção por *Clostridium perfringens*, o qual é encontrado nas quelíceras das aranhas-marrons e produz toxinas que podem agravar a lesão dermonecrotica (MONTEIRO *et al.*, 2002).

Em casos mais graves de loxoscelismo, pode ocorrer a intervenção cirúrgica com excisão do tecido de 2 a 8 semanas após o envenenamento. Se a ferida apresentar complicações, pode ser realizada cirurgia plástica para a reconstituição do tecido (HOGAN *et al.*, 2004).

O uso de soro anti-veneno loxoscélico ainda é controverso (DA SILVA *et al.*, 2004; PAULI *et al.*, 2006). Em alguns casos, o soro anti-veneno loxoscélico é utilizado no tratamento do loxoscelismo em humanos, contudo, há evidências de que o soro não é eficiente (SCHENONE *et al.*, 1989; SCHENONE, 2003). Contrariamente, foi observado que aproximadamente 70% dos pacientes que receberam o tratamento com soro anti-veneno loxoscélico até 72 horas após a picada não desenvolveram dermonecrose ou sintomas de

loxoscelismo sistêmico, como insuficiência renal aguda e coagulação intravascular disseminada (MALAQUE *et al.*, 2002).

Ainda, estudos com animais demonstraram que o soro anti-veneno loxoscélico é eficiente no tratamento de loxoscelismo (BARBARO *et al.*, 2005; DE OLIVEIRA *et al.*, 2005; BRAVO *et al.*, 1993; GUILHERME *et al.*, 2001). Além disso, foi observado que o uso de soro anti-veneno está envolvido na diminuição da dermonecrose em coelhos 24, 36 e 48 horas após o envenenamento, suportando a hipótese de que a eficácia do soro é evidente, mesmo não sendo capaz de neutralizar a resposta inflamatória de maneira significativa (PAULI *et al.*, 2009). No entanto, em estágios mais avançados de dermonecrose, o tratamento com soro anti-veneno loxoscélico não apresenta uma resposta eficiente, mostrando que mais estudos são necessários para elucidar a eficácia do tratamento de casos de loxoscelismo com soro anti-veneno loxoscélico (MALAQUE *et al.*, 2011; ISBISTER, 2002; ISBISTER *et al.*, 2003).

2.6 Veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*

O veneno loxoscélico é um fluído cristalino composto por enzimas, peptídeos e nucleotídeos (Figura 4A), sendo produzido por um par de glândulas localizado no cefalotórax do animal (DA SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992; APPEL *et al.*, 2005) (Figura 4B). As células epiteliais das glândulas produtoras de veneno são ricas em organelas como retículo endoplasmático e complexo de Golgi, estruturas estas que estão diretamente envolvidas com a produção do veneno (DOS SANTOS *et al.*, 2000).

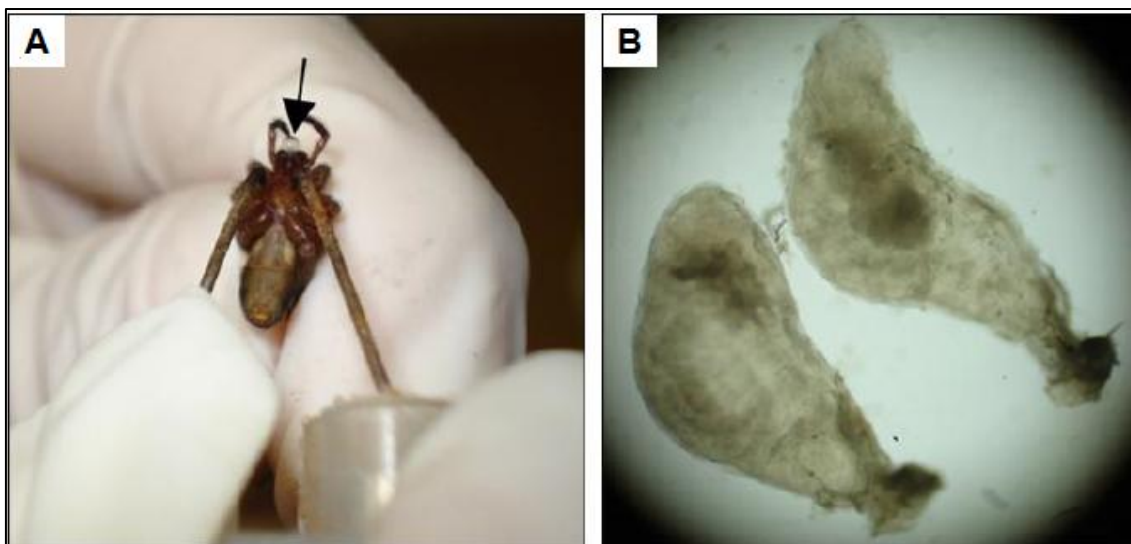


FIGURA 4 – CARACTERÍSTICAS DO VENENO E GLÂNDULA PRODUTORA DE VENENO DE *Loxosceles intermedia*. (A) Gotícula de veneno (seta) secretada após aplicação de eletrochoque ao cefalotórax da aranha. (B) Par de glândulas produtoras de veneno visualizadas sob microscopia de luz. Aumento de 40x. Adaptado de Chaim et al., 2011a.

A quantidade de veneno produzida é variável entre as espécies de aranha-marrom, de acordo com o tamanho e sexo do animal, disposição de alimento, entre outros fatores (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005; DE OLIVEIRA *et al.*, 1999; TAMBOURGI *et al.*, 2010). O volume médio de veneno inoculado por aranhas adultas do gênero *Loxosceles* durante a picada é de aproximadamente 4 μ L e contém de 30 a 100 μ g de proteínas (SAMS *et al.*, 2001; TAMBOURGI *et al.*, 2010).

Análises eletroforéticas demonstraram que o perfil protéico do veneno apresenta predominantemente moléculas de baixa massa molecular (1-45 kDa) (DA SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005; DA SILVEIRA *et al.*, 2002). Em contraste, as moléculas de alta massa molecular são expressas em quantidades inferiores (BARBARO *et al.*, 1992; VEIGA *et al.*, 2000b; MACHADO *et al.*, 2005). Contudo, apesar da variada gama de componentes do veneno, acredita-se que sua ação é decorrente do efeito combinado de todos os seus constituintes e não de uma única molécula agindo isoladamente (DA SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005; VEIGA *et al.*, 1999).

A identificação das toxinas presentes no veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* tem sido o foco de muitos estudos, sendo que algumas toxinas já foram identificadas e caracterizadas bioquímica e biologicamente (DA SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005). Dentre estas toxinas podem ser citadas:

fosfatase alcalina, 5'-nucleotídeo fosfohidrolases (FUTRELL, 1992), nucleosídeos sulfatados (SCHROEDER *et al.*, 2008), hialuronidades (BARBARO *et al.*, 2005; YOUNG e PINCUS, 2001; DA SILVEIRA *et al.*, 2007b), fosfolipases-D (CHAIM *et al.*, 2006; DE ANDRADE *et al.*, 2005; DA SILVEIRA *et al.*, 2006; APPEL *et al.*, 2008; DA SILVEIRA *et al.*, 2007c), serinoproteases (VEIGA *et al.*, 2000b), metaloproteases (FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000a; VEIGA *et al.*, 2001a; VEIGA *et al.*, 2001b), e toxinas inseticidas (DE CASTRO *et al.*, 2004).

Ainda, a análise do perfil de transcritos da glândula produtora de veneno de *Loxosceles intermedia* demonstrou que aproximadamente 43% dos transcritos obtidos correspondem a toxinas (Figura 5A). A análise do transcriptoma permitiu a identificação de novos componentes como: metaloproteases do tipo astacina (as quais possuem grande representatividade por serem o segundo grupo com maior número de transcritos – aproximadamente 23%), peptídeos inseticida similares a notinas, alérgeno, proteína tumoral controlada traducionalmente (TCTP), inibidores de serinoproteases e neurotoxinas similares a Magi-3 (CHAIM *et al.*, 2011a; TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010; GREMSKI *et al.*, 2010; CORZO *et al.*, 2003; SADE *et al.*, 2012) (Figura 5B).

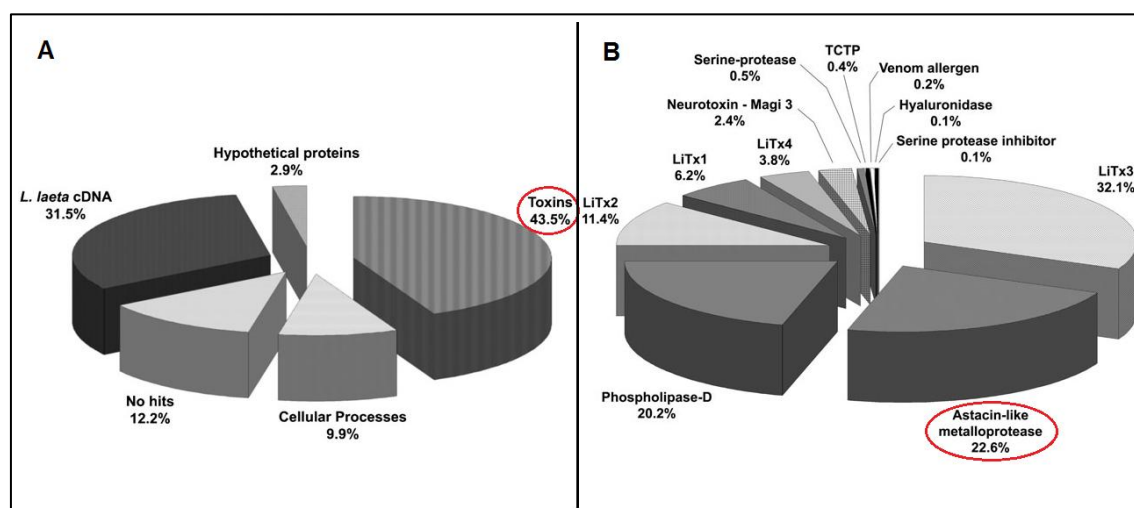


FIGURA 5 – TRANSCRIPTOMA DA GLÂNDULA DE VENENO DE *Loxosceles intermedia*. (A) Proporções dos transcritos agrupados de acordo com suas classes, com destaque para as toxinas (B) Proporções relativas de cada grupo de toxinas em relação ao total de transcritos que codificam para toxinas, com destaque para as metaloproteases do tipo astacina. Adaptado de Gremski *et al.*, 2010.

Corroborando com os dados obtidos a partir do transcriptoma mencionado anteriormente, análises de proteomas do veneno de *Loxosceles intermedia* permitiram a identificação de proteínas com massa molecular variando entre 14 a 95kDa, dentre elas metaloproteases, serino proteases, hialuronidases, esfingomielinases, inibidores de serino proteases, além de possíveis neurotoxinas e alérgenos (MACHADO *et al.*, 2005; DOS SANTOS *et al.*, 2009).

Vale destacar que entre as toxinas presentes no veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*, as fosfolipases-D são as que se encontram melhor caracterizadas em relação a sua estrutura e atividade bioquímica e biológica (CHAIM *et al.*, 2011a; DE ANDRADE *et al.*, 2006). Em relação a sua estrutura, estas enzimas possuem regiões conservadas, principalmente no sítio catalítico, exibem um peptídeo sinal seguido de um pró-peptídeo e possuem massa molecular de 30 a 35 kDa (DA SILVA *et al.*, 2004; BARBARO *et al.*, 2005; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007; DE GIUSEPPE *et al.*, 2011). Estas toxinas, seja na forma nativa ou recombinante, são capazes de induzir experimentalmente dermonecrose (CHAIM *et al.*, 2011b; APPEL *et al.*, 2008), resposta inflamatória (CHAIM *et al.*, 2011b; PALUDO *et al.*, 2009), agregação plaquetária (DA SILVEIRA *et al.*, 2006; APPEL *et al.*, 2008), hemólise (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011), aumento da permeabilidade vascular (DA SILVEIRA *et al.*, 2006; APPEL *et al.*, 2008), nefrotoxicidade (CHAIM *et al.*, 2006; KUSMA *et al.*, 2008) e efeitos citotóxicos em linhagens celulares estabelecidas (RIBEIRO *et al.*, 2007).

2.6.1 Metaloproteases do veneno loxoscélico

Dentre as classes de toxinas identificadas em venenos loxoscélicos estão as metaloproteases do tipo astacina. Nos primeiros estudos com o veneno total de *Loxosceles intermedia* foram observadas duas regiões por eletroforeses com atividade proteásica, identificadas como: Loxolisina A, com massa molecular de 20 – 28 kDa, a qual apresenta atividade fibronectinolítica, fibrinogenolítica e se liga a gelatina; e Loxolisina B, com massa molecular de 30 – 32 kDa, a qual apresenta apenas atividade gelatinolítica. Além de moléculas de fibrinogênio e fibronectina, estas enzimas também podem

hidrolisar entactina e o núcleo proteico de heparan sulfato. Uma vez que verificou-se a perda da atividade proteolítica das enzimas ao usar quelantes de metais divalentes como EDTA e 1,10-fenantrolina, estas proteases foram caracterizadas como metaloproteases (DA SILVEIRA *et al.*, 2002; FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000a; ZANETTI *et al.*, 2002).

As enzimas Loxolisina A e Loxolisina B são glicoproteínas ricas em manose, entretanto, a Loxolisina A também possui resíduos de N-acetilglicosamina e fucose. Foi demonstrado que estes carboidratos presentes na Loxolisina A não são necessários para a atividade da enzima, uma vez que a degradação de fibronectina e fibrinogênio não foi afetada após a remoção enzimática de carboidratos da proteína. Por outro lado, os carboidratos presentes na Loxolisina B são essenciais para a atividade desta enzima sobre moléculas de gelatina (VEIGA *et al.*, 1999).

Estudos avaliando a ação do veneno total de *L. intermedia* sobre a membrana basal de células tumorais da linhagem EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) demonstraram que metaloproteases do veneno são capazes de hidrolisar entactina e o núcleo proteico de heparan sulfato, danificando a membrana basal. Desta forma foi postulado que a ação destas metaloproteases pode estar associada à insuficiência renal após o envenenamento (VEIGA *et al.*, 2000a). Suportando esta hipótese, um estudo posterior demonstrou a ação do veneno total de *L. intermedia* em rins de camundongos, onde foram observados danos ao glomérulo e túbulos proximais e distais. Toxinas do veneno foram capazes de causar citotoxicidade de podócitos, resultante da perda de pedicelos, alteração de estruturas de filtração (como o endotélio fenestrado) e redução da membrana basal; e necrose das células do epitélio tubular, evidenciada por vacuolização, destruição de mitocôndrias, presença de retículo endoplasmático liso proeminente e autofagossomos (LUCIANO *et al.*, 2004). Além disso, efeitos como alterações morfológicas no endotélio de vasos sanguíneos com destruição da membrana basal subendotelial, formação de redes de fibrina e trombo no lúmen dos vasos também foram verificados (ZANETTI *et al.*, 2002).

Devido ao fato de que o método de extração de veneno total (eletrochoque no cefalotórax) de *Loxosceles intermedia* poderia estar sujeito à contaminação com egesta abdominal, a qual é constituída por enzimas

proteolíticas que poderiam resultar na hidrólise dos substratos das metaloproteases previamente citadas, a coleta do veneno foi realizada diretamente das glândulas produtoras de veneno, logo, livre de contaminantes (DA SILVEIRA *et al.*, 2002).

Foi comprovado que as proteases com massa molecular de 32 – 35 kDa estão presentes no veneno da aranha e são realmente responsáveis pela hidrólise de fibronectina e fibrinogênio, corroborando com os dados obtidos por outros autores (DA SILVEIRA *et al.*, 2002; FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000a; VEIGA *et al.*, 1999; VEIGA *et al.*, 2001a; VEIGA *et al.*, 2001b). Além disso, foi verificado que o veneno de *Loxosceles laeta* também possui metaloproteases de 32 – 35 kDa com atividade gelatinolítica (DA SILVEIRA *et al.*, 2002) e que metaloproteases semelhantes estão presentes em outras espécies de aranhas-marrons, sendo descritas nos venenos de *L. rufescens*, *L. deserta*, *L. reclusa* e *L. laeta* (BARBARO *et al.*, 2005; YOUNG e PINCUS, 2001; FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2002).

Através de uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *Loxosceles intermedia*, foi realizada a clonagem e expressão de uma metaloprotease recombinante que hidrolisa moléculas de fibronectina, fibrinogênio e gelatina, além de resultar em alterações morfológicas e perda de adesão em células subendoteliais de coelho. Neste mesmo estudo foi mostrado que a protease obtida pertence à família de metaloproteases do tipo astacina por apresentar os motivos estruturais característicos que definem a família – o motivo de ligação ao zinco (HEXXHXXGXXHE – onde “X” representa qualquer aminoácido) e a volta de metionina (SXMHY). Por sua vez, esta metaloprotease foi nomeada *Loxosceles Astacin-Like Metalloprotease* (LALP1) (BODE *et al.*, 1993; DA SILVEIRA *et al.*, 2007a; STOCKER *et al.*, 1993).

Foi mostrado que a LALP1 possui sequência nucleotídica composta por 900 pares de base. A sequência aminoacídica deduzida é constituída de: um pré-peptídeo (peptídeo sinal) com 16 resíduos de aminoácidos, um pró-peptídeo com 35 resíduos de aminoácidos, e o domínio catalítico com 213 resíduos de aminoácidos. Por meio de ferramentas de bioinformática foi verificado que a LALP1 possui massa molecular aproximada de 28,6kDa com pI de 6,09. Ainda, esta enzima apresenta quatro resíduos de cisteínas que possivelmente formam pontes dissulfeto e dois possíveis sítios de N-

glicosilação (NGS e NNT) (Figura 6). Este foi o primeiro membro da família das astacinas descrito no veneno de *Loxosceles* e acredita-se que esta protease possua efeitos tóxicos no processo de envenenamento pela aranha-marrom. A descoberta foi de grande significância, uma vez que anteriormente não havia sido caracterizada nenhuma metaloprotease do tipo astacina presente em venenos animais (DA SILVEIRA *et al.*, 2007a).

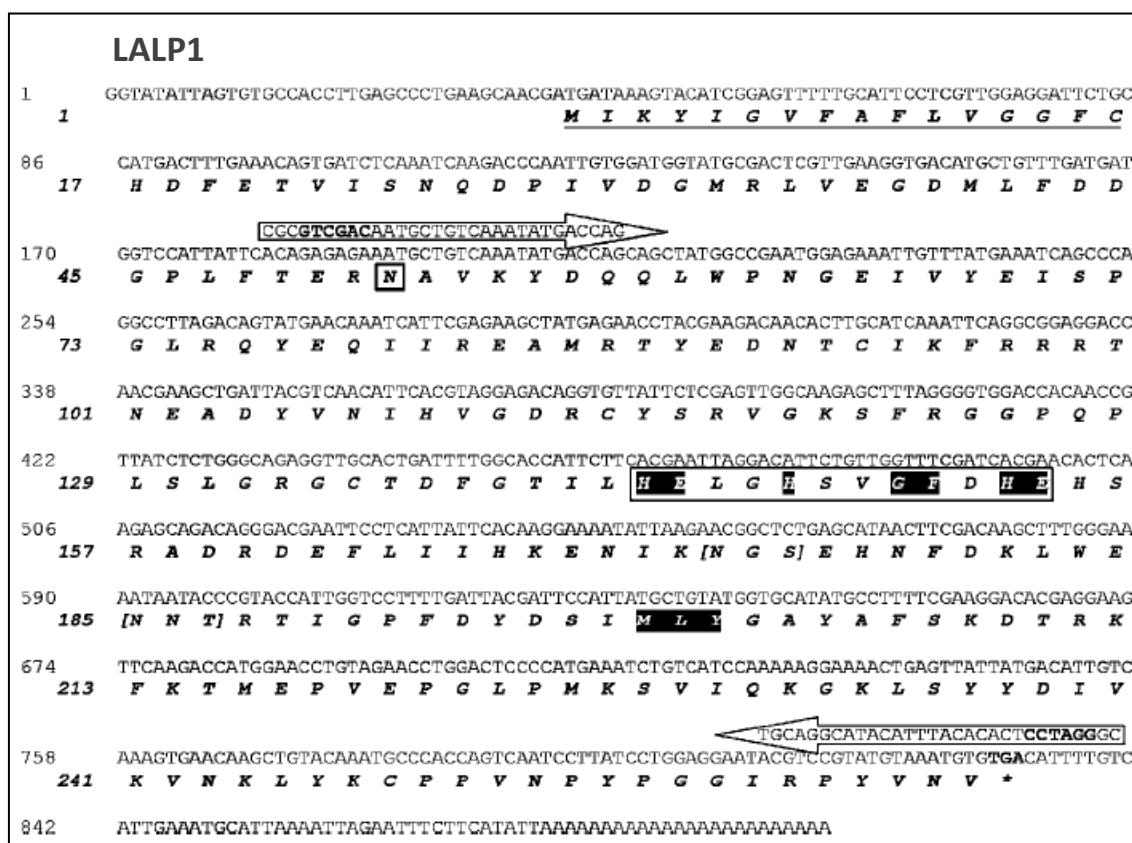


FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICA E AMINOACÍDICA PREDITA DA LALP1. Em destaque estão mostrados o peptídeo sinal no início da sequência (sublinhado), o primeiro aminoácido (asparagina) da sequência do domínio catalítico e as assinaturas da família das astacinas (motivo de ligação ao zinco e volta de metionina), representados em caixa. Entre colchetes estão representados os possíveis sítios de N-glicosilação. As setas representam os oligonucleotídeos utilizados para a clonagem da LALP1.

Estudos posteriores demonstraram que as proteínas do tipo astacina constituem uma família gênica em aranhas do gênero *Loxosceles*, uma vez que na espécie *Loxosceles intermedia* foram identificadas e clonadas duas novas isoformas presentes no veneno, denominadas LALP2 e LALP3. Ao comparar as sequências aminoacídicas preditas, foi observado que a LALP2 possui 43% de identidade com LALP1, ao passo que a LALP3 possui 46%. Além disso,

foram identificadas pelo menos uma isoforma de metaloprotease do tipo astacina no veneno de *Loxosceles laeta* (LALP4) e uma isoforma no veneno de *Loxosceles gaucho* (LALP5) (TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010). Corroborando com estes dados, o transcriptoma da glândula produtora de veneno de *Loxosceles intermedia* revelou transcritos codificando para várias isoformas de LALPs e acredita-se que ao menos mais duas isoformas estejam presentes no veneno de *L. intermedia* (GREMSKI *et al.*, 2010).

2.7 Metaloproteases dependentes de zinco

As metaloproteases ou metaloendopeptidases são enzimas que constituem uma grande família de proteínas envolvidas em diversos processos biológicos, presentes em organismos de todos os reinos. Nesta grande família estão incluídas as metaloproteases dependentes de zinco, sendo que as mesmas se encontram divididas em dois subgrupos segundo a classificação apresentada na base de dados de peptidases MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>): as inverzincinas e as zincinas. A família das zincinas é representada por proteases que apresentam o sítio catalítico conservado **HEXXH** com duas histidinas como ligantes ao zinco e um glutamato envolvido na catálise. As zincinas são divididas em três outras subfamílias: as metzincinas, as gluzincinas e as aspzincinas (GOMIS-RUTH, 2003; STERCHI, 2008; BALABAN *et al.*, 2012) (Figura 7).

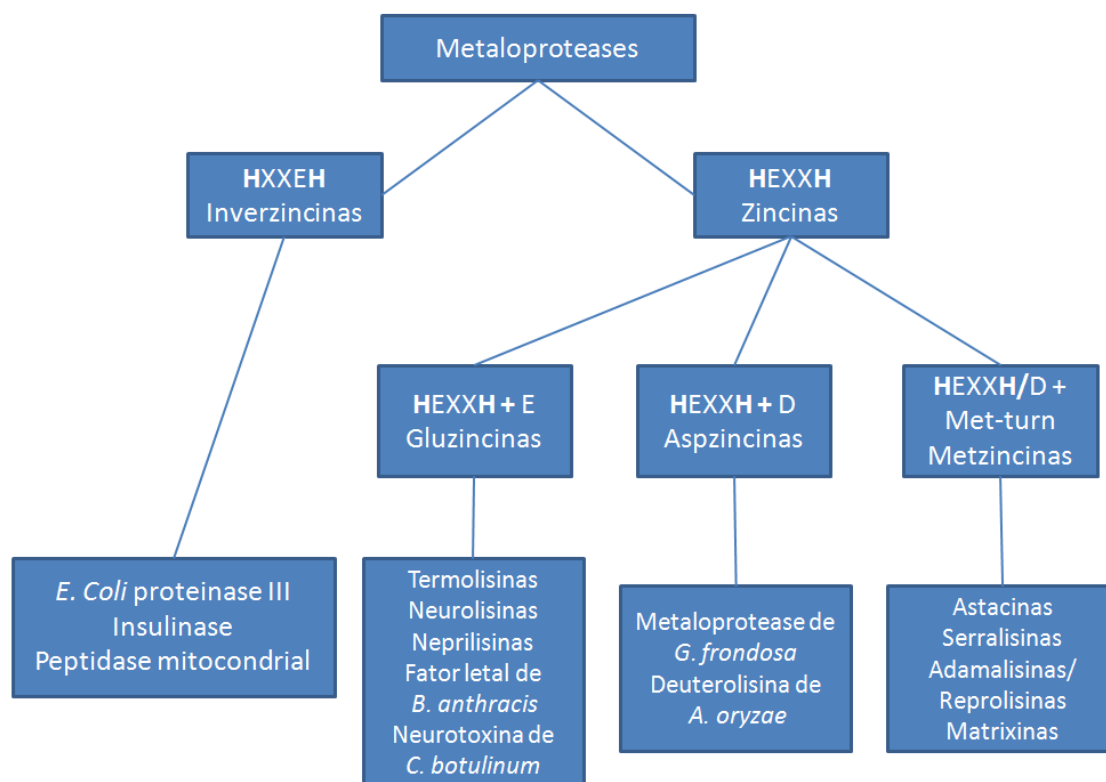


FIGURA 7 – CLASSIFICAÇÃO DAS METALOPROTEASES DE ACORDO COM A ESTRUTURA DO SÍTIO CATALÍTICO. Adaptado de Balaban et al., 2012.

A família das metzincinas (classificação MEROPS: MA) é representada por membros contendo o “motivo/sequência consenso de ligação ao zinco” (HEXXHXXGXXH) com três histidinas como ligantes ao zinco. Além disso, estas proteínas também dispõem de um segundo motivo estrutural conhecido como “volta de metionina”, a qual forma um “loop” característico com uma metionina conservada. Ambos os motivos estruturais são assinaturas que caracterizam a família das metzincinas (BODE *et al.*, 1993; GOMIS-RUTH, 2003; STERCHI, 2008; BALABAN *et al.*, 2012; STOCKER e BODE, 1995) (Figura 8). Esta família é representada por diferentes tipos de enzimas, as quais podem ser diferenciadas em subfamílias distintas atuando em processos tais como embriogênese, homeostase, morfogênese de tecidos, ovulação e fertilização, proliferação e migração celular, progressão do ciclo celular e apoptose, artrite e câncer (HOOPER, 1994; LOPEZ-OTIN e OVERALL, 2002).

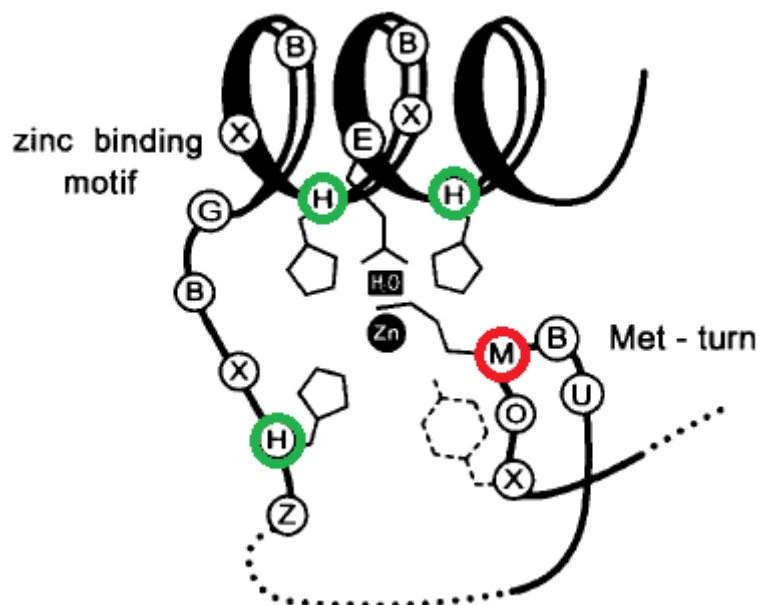


FIGURA 8 – MOTIVOS ESTRUTURAIS CARACTERÍSTICOS DAS METZINCINAS. Representação do motivo consenso de ligação ao zinco, com destaque para as três histidinas ligantes ao zinco em verde, e da volta de metionina, com a metionina conservada destacada em vermelho. Adaptado de Stocker e Bode, 1995 e Balaban *et al*, 2012.

De acordo com pequenas diferenças no sítio catalítico e a presença de outros domínios estruturais, as metzincinas são representadas por outros grupos de endopeptidases que já foram caracterizados a nível estrutural: as astacinas, matrixinas, serralisinas, ADAMs/adamalisinas/reprolisinas, snapalisinas, leishmanolisinas e papalisinas. A partir de análises de sequenciamento de genomas, outros membros das metzincinas que não foram caracterizados estruturalmente foram descritos: as fragilisinas, turingilisinas, gametolisinas, archaemetzincinas, coelilisinas, helicolisinas, ascomicolisinas e colerilizinas (BODE *et al.*, 1993; GOMIS-RUTH, 2003; STOCKER e BODE, 1995; GOMIS-RUTH, 2009).

2.7.1 Metaloproteases da família das astacinas

Em 1967, Pfleiderer e colaboradores descreveram uma nova endopeptidase do fluido digestivo do lagostim *Astacus astacus*. Esta proteína foi inicialmente chamada de “proteinase de baixo peso molecular” ou protease *Astacus*, e finalmente foi denominada astacina, sendo considerada como o

protótipo da família (GOMIS-RUTH *et al.*, 2012; DUMERMUTH *et al.*, 1991; STOCKER *et al.*, 1991).

Estudos têm mostrado que as enzimas da família das astacinas estão envolvidas nos processos descritos anteriormente e são muito importantes para os organismos vivos devido à sua ação sobre a matriz extracelular. As enzimas UVS.2 (de embriões de rã), LCE/HCE (do peixe *Oryzias latipes*), tolóide (de embriões de *Drosophila*) e BP10 (de embriões de ouriço-do-mar) por exemplo, estão envolvidas em processos de desenvolvimento, diferenciação de tecidos e eclosão de ovos (SATO e SARGENT, 1990; SHIMELL *et al.*, 1991; YASUMASU *et al.*, 1992; LEPAGE *et al.*, 1992; REYNOLDS *et al.*, 1992).

Metaloproteases do tipo astacina de mamíferos também estão associadas a diferentes funções, como: BMP1 e tolóide, TLL1 e TLL2 (associadas à modificação da matriz extracelular e desenvolvimento de tecido muscular) (KESSLER *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1996; HOPKINS *et al.*, 2007), ovastacina (associada ao desenvolvimento embrionário) (QUESADA *et al.*, 2004) e meprinas α e β (associadas à diferenciação tecidual, proliferação e migração celular, e sinalização pericelular) (STERCHI, 2008; SCHUTTE *et al.*, 2010; JEFFERSON *et al.*, 2011; BECKER-PAULY *et al.*, 2011). Estudos recentes evidenciaram que a meprina α é superexpressa em células de câncer colorretal e está envolvida no aumento da proliferação e migração celular (MINDER *et al.*, 2012). Em *Bombyx mori* (bicho-da-seda) foi identificada uma nova metaloprotease do tipo astacina – BmHEII – que além de promover a eclosão de ovos, também pode estar envolvida na espermatogênese (TANG *et al.*, 2012). Em outros processos de desenvolvimento, foi constatado que a metaloprotease ovastacina cliva o domínio N-terminal da glicoproteína ZP2 (presente na zona pelúcida de ovócitos de camundongos), desta forma evitando a interação de espermatozoides com a ZP2, assegurando a fertilização monospérmica (BURKART *et al.*, 2012).

A estrutura básica das metaloproteases do tipo astacina consiste em um domínio catalítico composto por aproximadamente 200 resíduos de aminoácidos, como ocorre em procariotos. Em eucariotos, a esta estrutura estão associados um pré-peptídeo, o qual é o sinal para secreção, e um pró-peptídeo, o qual confere latência de forma que estas enzimas sejam

secretadas na forma de zimogênio (TITANI *et al.*, 1987; YIALLOUROS *et al.*, 2002; GUEVARA *et al.*, 2010).

Geralmente, os domínios catalíticos das astacinas se assemelham a uma estrutura riniforme com uma fenda estreita dividindo a estrutura em dois subdomínios de aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos cada: o subdomínio N-terminal (também conhecido como subdomínio superior) e o subdomínio C-terminal (também conhecido como subdomínio inferior) (BODE *et al.*, 1992; GOMIS-RUTH *et al.*, 1993) (Figura 9).

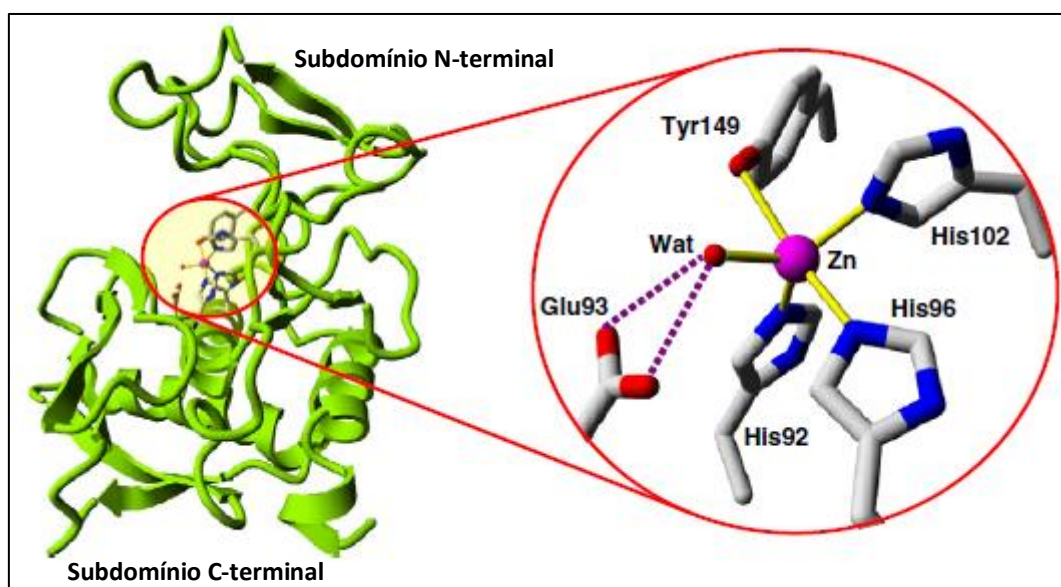


FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO DO DOMÍNIO CATALÍTICO DA ASTACINA DE *Astacus astacus*. Visualização da estrutura geral da astacina, evidenciando os subdomínios N-terminal e C-terminal, com destaque para o sítio catalítico em mostrado em detalhe. Adaptado de Chen *et al.*, 2012.

Os primeiros estudos estruturais envolvendo estas metaloproteases, demonstraram que a astacina de *Astacus astacus*, após assumir sua conformação correta, tem sua região N-terminal localizada próxima ao sítio ativo da enzima. Estas proteases possuem um íon zinco interagindo com o sítio catalítico, e a ligação do íon ao sítio é estabilizada por três histidinas (Figuras 8 e 9) (GOMIS-RUTH *et al.*, 1993). Sabe-se também que o pró-peptídeo da astacina de *Astacus astacus* está intimamente associado ao sítio ativo da enzima, assumindo uma conformação específica de maneira que ele bloqueie o acesso ao sítio, inibindo a atividade da enzima. Após a clivagem do pró-peptídeo no processo de maturação da enzima, o qual é realizado em dois

passos, a astacina se torna ativa de modo que o acesso da fenda catalítica ao substrato é liberado (GUEVARA *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2012).

A integridade estrutural das astacinas é mantida por pelo menos duas pontes dissulfeto que promovem a ligação dos domínios N-terminal e C-terminal e auxiliam na conformação da fenda catalítica, de modo que estes resíduos de cisteína tendem a ser conservados entre as metaloproteases do tipo astacina (STOCKER *et al.*, 1993; GOMIS-RUTH *et al.*, 2012). Adicionalmente, ainda em estudos envolvendo a astacina de *A. astacus*, foi demonstrado que os três primeiros aminoácidos do peptídeo maduro ficam inseridos dentro da molécula em uma posição próxima ao sítio catalítico, de modo que uma rede de pontes de hidrogênio essenciais para a integridade estrutural da enzima é formada (BODE *et al.*, 1992). Além disso, a primeira alanina do peptídeo maduro interage com o ácido glutâmico 103 (conservado em todas as astacinas) por meio de uma ponte salina mediada por moléculas de água, a qual não é essencial para a atividade da enzima, mas a torna termodinamicamente mais estável (GOMIS-RUTH *et al.*, 2012; YIALLOUROS *et al.*, 2002). Em outras metaloproteases do tipo astacina observa-se que resíduos de asparagina no início da cadeia do peptídeo maduro também estabelecem esta interação com o ácido glutâmico 103 (STOCKER *et al.*, 1993).

Além do domínio catalítico, algumas astacinas possuem domínios adicionais à região C-terminal, como domínios TRAF (ROTHE *et al.*, 1994; ZAPATA *et al.*, 2001), MAM (BECKMANN e BORK, 1993; YAN *et al.*, 2000a; YAN *et al.*, 2000b; BECKER-PAULY *et al.*, 2009) e CUB e semelhantes à EGF (STOCKER e BODE, 1995; BOND e BEYNON, 1995).

2.8 Potencial biotecnológico das metaloproteases do tipo astacina do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles*

Estudos envolvendo proteases do tipo astacinas no veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* devem desenvolver novos conhecimentos sobre estas proteínas, já que estas possuem ampla aplicação biotecnológica. Elas podem ser utilizadas em protocolos para pesquisa médica e farmacêutica, tais como remodelagem e associação da matriz extracelular. Outras aplicações potenciais

para estas moléculas envolvem seu uso em estudos como co-adjuvantes na administração de fármacos, diferenciação celular, tumorigênese e metástase, ativação enzimática (latência e ativação de zimogênios), sinalização celular baseada em proteólise, resposta inflamatória e permeabilidade vascular. Ainda, as astacinas de *L. intermedia* podem ser utilizadas como agentes trombolíticos e para o desenvolvimento de inibidores de metaloproteases da família das astacinas, os quais podem ser utilizados na prevenção da formação de placas arterioscleróticas (CHAIM *et al.*, 2011a; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008; GAO *et al.*, 2009).

2.9 Metaloproteases do tipo astacina recombinantes

A astacina de *A. astacus* foi a primeira enzima da família a ser obtida através da expressão recombinante utilizando sistema procariótico. Contudo, verificou-se que após a expressão da proteína, esta foi obtida na forma de corpos de inclusão (agregados proteicos), de modo que foi necessário o emprego de técnicas de redobramento *in vitro* (*refolding*) para a obtenção da proteína recombinante na condição solúvel. Neste caso a técnica consistiu na desnaturação da astacina e posterior redobramento na presença de um par *redox* (glutathiona reduzida e glutathiona dissulfeto - GSH:GSSG) (REYDA *et al.*, 1999).

Além da astacina de *Astacus astacus*, protótipo da família das astacinas, outras metaloproteases deste grupo de enzimas foram obtidas através da expressão recombinante utilizando organismos procarióticos, de modo que na maioria dos casos, técnicas de redobramento *in vitro* foram necessárias. Após a expressão da ovastacina de humanos, a proteína recombinante foi obtida em corpos de inclusão, de modo que o *refolding* foi realizado por meio da desnaturação da proteína (utilizando DTT) e renaturação através de diálise contra tampão Tris (QUESADA *et al.*, 2004). Ainda, a BP10, astacina do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* foi obtida após expressão em corpos de inclusão e redobramento *in vitro* por meio da desnaturação da proteína recombinante (utilizando ureia) e renaturação através de diálise contra tampão Tris na presença de cloreto de guanidina e L-arginina para favorecer a solubilidade (DA SILVA *et al.*, 2006). Contrariamente, a astacina do nematódeo

Steinernema carpocapsae foi expressa em sistema bacteriano e obtida na condição solúvel sem a aplicação de técnicas de redobramento *in vitro* (JING *et al.*, 2010).

Ainda, outros autores realizaram a expressão de metaloproteases do tipo astacina utilizando células de inseto (provenientes de *Spodoptera frugiperda*) para a obtenção das proteínas recombinantes na condição solúvel. A exemplo disso tem-se que as metaloproteases do tipo astacina ASLM-I (de músculo do molusco *Loligo bleekeri*) (YOKOZAWA *et al.*, 2002), MET-1 (do nematódeo *Ostertagia ostertagi*) (DE MAERE *et al.*, 2005), e LAST e LAST-MAM (do carangueijo *Limulus polyphemus*) (BECKER-PAULY *et al.*, 2009), expressas em células SF9; e a meprina alfa de humanos, expressa em células SF21, foram obtidas na condição solúvel sem a aplicação de técnicas de redobramento *in vitro* (KOHLENER *et al.*, 2000).

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Obter uma nova isoforma de astacina presente no veneno de *Loxosceles intermedia* por meio de técnicas de clonagem e expressão heteróloga.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a clonagem do cDNA referente à toxina LALP3 madura a partir da biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de *Loxosceles intermedia*;
- Obter a toxina LALP3 madura recombinante por meio de expressão e purificação em sistema bacteriano;
- Avaliar a atividade bioquímica da toxina LALP3 madura purificada através de ensaios *in vitro*.

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Espécimes de aranha-marrom *Loxosceles intermedia*

Para extração do veneno, foram utilizadas aranhas adultas da espécie *Loxosceles intermedia* coletadas em Curitiba e Região Metropolitana (Paraná) e mantidas em condições apropriadas no Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos da Universidade Federal do Paraná. A utilização de animais para finalidade científica foi aprovada pelo Sistema de Autorização em Informação da Biodiversidade (SISBIO), sendo o número do documento da autorização: **29801-1**.

4.2 Predição das estruturas tridimensionais da LALP3

A predição da estrutura tridimensional da LALP3 madura foi realizada com o auxílio do software de modelagem *online* SwissModel Automatic Modelling Mode, disponível em <http://swissmodel.expasy.org> (PEITSCH, 1995; ARNOLD *et al.*, 2006; KIEFER *et al.*, 2009). Foi utilizado como parâmetro de modelagem o *Automated Mode* com alinhamento no formato *FASTA*. A estrutura utilizada para a realização da modelagem da LALP3 foi a astacina de *Astacus astacus* (código PDB:1AST) cristalizada e analisada por Gomis-Ruth *et al.* (1993). A visualização da estrutura foi realizada no software para visualização molecular *opensource* Open Astex Viewer 3.0 (Astex Therapeutics Ltd.), disponível em <http://openastexviewer.net/web/>.

4.3 Obtenção do inserto por PCR com Pfu DNA polimerase

Com base na sequência do precursor da LALP3 depositada no GenBank (número GQ227491.1) foram desenhados oligonucleotídeos gene específicos *sense* (5'-G GAA TTC CAT ATG AAC GCT CTC AAG-3') e *antisense* (3'-CCG CTC GAG AAA TTT GTC-5') para a amplificação do cDNA relativo a sequência da LALP3 madura. Como molde foi utilizada a construção proveniente de uma

minipreparação plasmidial da biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *L. intermedia* contendo a sequência do precursor da LALP3, disponível em vetor pSPORT-1. A reação de PCR foi realizada em um tubo contendo os oligonucleotídeos (0,5 μ M), tampão para Pfu (1x), molde (vetor – 70ng), dNTP mix (0,2mM) e Pfu DNA Polimerase (1,25U/ μ L). Protocolo adaptado de Trevisan-Silva *et al.* (2010).

4.4 Extração dos fragmentos do gel de Agarose

A análise do produto de PCR e da integridade do vetor de clonagem pGEM-T foi realizada utilizando gel de agarose 1,5% seguindo protocolos adaptados de Trevisan-Silva *et al.* (2010) e da Silveira *et al.* (2007). O gel foi submetido à fonte de luz negra com emissão em 380nm e as bandas visualizadas correspondentes ao esperado (em pares de base) foram recortadas com auxílio de bisturi. Os fragmentos foram colocados em microtubos e o DNA foi extraído com auxílio do kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (General Electric).

4.5 Adenilação do Inserto para ligação em vetor de clonagem pGEM-T

A reação de adenilação do inserto foi realizada utilizando a enzima Taq DNA Polimerase (1,25U/ μ L), tampão para a Taq (1x), MgCl₂ (1,5mM), dATPs (0,2mM) e o produto da gel extração. A amostra foi incubada a 70°C por 25 minutos em termociclador. Protocolo adaptado de Sambrook e Russel (2001).

4.6 Extração do inserto adenilado do gel de agarose

O produto da reação de adenilação do inserto foi aplicado a um gel de agarose 1,5% e submetido à eletroforese em cuba horizontal a 75V. Após a eletroforese o gel foi submetido à fonte de luz negra com emissão em 380nm e a banda visualizada correspondente ao inserto adenilado foi excisado e submetido a gel extração como descrito no item 4.4 de Material e Métodos. Protocolo adaptado de da Silveira *et al.* (2007) e Trevisan-Silva *et al.* (2010).

4.7 Reação de Ligação em vetor pGEM-T

A reação de ligação foi realizada seguindo o protocolo adaptado por Trevisan-Silva *et al.* (2010). O DNA amplificado foi diluído em água, dosado e o volume correspondente a 0,075pmol deste inserto foi inserido em microtubo PCR. Posteriormente foi adicionado 50ng do vetor pGEM-T (vetor A-T), tampão ligase (1x) e T4 DNA ligase (3U/ μ L). A reação foi incubada a 16°C por 16h. Em seguida a amostra foi precipitada com acetato de sódio 3M - pH 6,0 e etanol absoluto (0,1v:3v de amostra), centrifugada e submetida a uma série de lavagens com etanol 70% e por fim ressuspensa em água estéril. Protocolo adaptado de da Silveira *et al.* (2007) e Trevisan-Silva *et al.* (2010).

4.8 Transformação bacteriana por eletroporação

A transformação foi realizada em solução contendo as bactérias DH5 α eletrocompetentes e a construção obtida após a reação de ligação LALP3/pGEM-T (1 μ L). A eletroporação foi efetuada com o auxílio do aparelho Gene Pulser X-Cell® (Bio-Rad) sob condições de 1.8kV, 25MF, 200% visando a obtenção de transformantes contendo a construção LALP3/pGEM-T. Após a transformação as bactérias foram ressuspensas em meio SOC (triptona 20g/L; extrato de levedura 5g/L; NaCl 0,5g/L; KCl 2,5mM; MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10mM, glicose 0,2M) e incubadas a 37°C por 1 hora, constituindo a fase de recuperação. Protocolo adaptado de da Silveira *et al.* (2007) e Trevisan-Silva *et al.* (2010).

4.9 Plaqueamento das bactérias transformadas

As bactérias recuperadas foram submetidas ao ensaio de alfa-complementação. Brevemente, este ensaio consiste na seleção de colônias transformadas pela observação da coloração branca apresentada pelos clones que incorporaram a construção LALP3/pGEM-T. Na presença de IPTG e do análogo à lactose X-GAL, as colônias que possuem apenas o vetor pGEM-T apresentam coloração azul, pois o IPTG atua como indutor da expressão do α -peptídeo que compõe a β -galactosidase, a qual por sua vez degrada o X-GAL,

produzindo um produto que confere a coloração às colônias. As colônias que incorporaram a construção LALP3/pGEM-T não são capazes de produzir a β -galactosidase e consequentemente não degradam o X-GAL, apresentando então coloração branca. Isso ocorre devido à inserção da sequência de cDNA referente à LALP3 no sítio de clonagem que inativa a sequência referente ao α -peptídeo.

As bactérias foram plaqueadas de duas maneiras: uma fração de 100 μ L foi plaqueada em uma placa constituída de meio LB ágar (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L, agar-ágar 15g/L), ampicilina (100 μ g/mL), IPTG (100mM - 100 μ L) e X-GAL (20mg/mL - 40 μ L); e a outra fração 900 μ L foi submetida a centrifugação e ressuspensa em 100 μ L de meio SOC para o plaqueamento. O plaqueamento foi realizado com alça de Drigalski e as placas foram incubadas a 37° C em incubadora do tipo BOD 411-D (Nova Ética) por 16 horas. Protocolo adaptado de da Silveira *et al.* (2007) e Trevisan-Silva *et al.* (2010).

4.10 PCR de colônia

Foram selecionadas colônias brancas para a realização de PCR de colônia de acordo com o protocolo adaptado de Appel *et al.* (2008) e da Silveira *et al.* (2007). Após a seleção das colônias, uma parte de amostra de cada colônia branca foi transferida para o fundo de um tubo de PCR e outra parte foi utilizada para a confecção de uma *masterplate* visando a obtenção de uma placa contendo apenas os clones selecionados para a avaliação por PCR de colônia. Aos tubos foi adicionado: tampão Taq DNA polimerase (1x), dNTPs (0,2mM), MgCl₂ (1,5mM), oligonucleotídeos sense e antisense do vetor – T7 e SP6 (0,2 μ M), e Taq DNA Polimerase (1,25U/ μ L). Após, a amostra foi incubada em um termociclador MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) para a amplificação do inserto sob as condições: 95°C/5min (1ciclo); 95°C/30s – média das TMs dos primers diminuídos de 5°C/30s – 72°C/1min (35 ciclos); 72°C/10min (1ciclo); 4°C até o preparo da amostra. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1,5% e as bandas foram visualizadas sob luz negra com emissão de 380nm. O resultado foi visualizado e registrado em aparelho de captura de imagem Chemidoc.

4.11 Pré-inóculo para processamento de sequenciamento

Para o pré-inóculo, foi utilizado o protocolo adaptado de Trevisan-Silva *et al.* (2010), onde a partir da *masterplate* os clones escolhidos foram repicados para um pré-inóculo contendo meio LB (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L) com ampicilina (100µg/mL) e incubados em tubo de 50ml sob agitação constante de 200rpm a 37°C por 16h. Após, foi realizada centrifugação para a obtenção de um precipitado bacteriano, o qual foi efetuada a extração dos plasmídeos com auxílio do kit para mini-extração plasmidial Pure Link Quick Plamid Miniprep Kit® (Qiagen). Por fim, as amostras foram quantificadas e analisadas quanto a qualidade no espectrofotômetro NanoVue Plus® (General Electric). As razões de absorbâncias analisadas foram 260/280nm e 260/230nm, onde 260nm é o espectro de absorbância do DNA, 280nm é o espectro de absorbância de proteínas, e 230nm é o espectro de absorbância de moléculas de fenol e EDTA. Foram consideradas amostras com pureza elevada quando apresentaram valores de $A_{260/280} > 1,8$ e $A_{260/230} > 2,0$.

4.12 PCR de seqüenciamento, precipitação e análise de sequenciamento

Foi utilizado o protocolo de sequenciamento Big Dye® adaptado de Chaim *et al.* (2006) e Appel *et al.* (2008), onde foi utilizado o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies), DNA molde (plasmídeos) e oligonucleotídeos do vetor pGEM-T (T7 e SP6). A reação foi realizada no termociclador MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) sob as seguintes condições: 95°C/20min - 50°C/15s - 60°C/4min (35 ciclos); 4°C até o preparo da amostra. Após precipitação e secagem do material, o produto foi ressuspendido em solução de corrida para a leitura no sequenciador ABI PRISM 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems® 3500). O resultado do sequenciamento foi analisado com o auxílio do software ChromasPro 1.5 e o alinhamento das sequências da LALP3 e dos clones obtidos realizado no software online ClustalW, disponível no site <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>, utilizando as configurações padrão do programa.

4.13 Subclonagem da sequência de LALP3 madura em vetor de expressão pET20b+

A partir da construção LALP3/pGEM-T, o cDNA referente a LALP3 madura foi modificado por PCR de alta fidelidade utilizando-se Pfu DNA polimerase com oligonucleotídeos gene específicos *sense* (5'-GGAATTCCATATGAACGCTCTCAAG-3') e *antisense* (3'-CTTTCCTGTTTAAAGAGCTCGCC-5') para originar um produto contendo nas extremidades sítios das enzimas de restrição NdeI e XhoI. O inserto foi ligado ao vetor de expressão pET-20b+ (Invitrogen) e fusionado a uma cauda de 6 histidinas na extremidade carboxi-terminal. Esta construção foi utilizada para transformação de células de bactérias eletrocompetentes da cepa DH5α. Os transformantes foram selecionados em meio LB-ágar (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L, agar-ágar 15g/L) contendo 100µg/mL de ampicilina e submetidos a PCR com oligonucleotídeos específicos do vetor (T7 e T7T) para confirmação da presença do inserto. Os clones positivos na PCR de colônia foram sequenciados para a verificação da presença do inserto e da fase de leitura correta. A construção obtida foi denominada LALP3/pET20b+.

Por conseguinte a construção LALP3/pET20b+ foi transformada em cepa *E. coli* SHuffle T7 Express LysY competente (New England Biolabs) por choque térmico. Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas em meio LB ágar (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L, agar-ágar 15g/L) contendo 100µg/mL de ampicilina e incubadas por 16 horas a 30°C em estufa B.O.D. As condições experimentais utilizadas para a subclonagem seguem os mesmos padrões utilizados para a obtenção da construção em vetor pGEM-T (descritos nos itens 4.3 – 4.12 de Material e Métodos). Protocolo adaptado de Trevisan-Silva *et al.* (2010) e da Silveira *et al.* (2007).

4.14 Subclonagem da sequência de LALP3 madura em vetor de expressão Champion pET-SUMO

A partir da construção obtida em vetor de clonagem pGEM-T, o cDNA referente a LALP3 madura foi modificado por PCR de alta fidelidade utilizando-se Pfu DNA polimerase com oligonucleotídeos gene específicos *sense*

(5'-AACGCTCTCAAGTATGACAG-3') e *antisense* (3'-CCTTTCCTGTTTAAGATTGGC-5) para a amplificação do cDNA relativo a sequência da LALP3 madura. Após a reação de PCR, o produto foi analisado em gel de agarose 1,5% e as bandas relativas ao inserto foram extraídas do gel e submetidas a gel purificação. Após, foi realizada a adenilação do inserto visando a ligação ao vetor de expressão Champion pET-SUMO (Vetor A-T) (Invitrogen). A construção obtida foi utilizada para transformação de células de bactérias eletrocompetentes da cepa DH5 α . Os transformantes foram selecionados em meio LB-ágar (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L, agar-ágar 15g/L) contendo 100 μ g/mL de ampicilina e submetidos a PCR com oligonucleotídeos específicos do vetor (SUMO Forward e T7T) para confirmação da presença do inserto. Os clones positivos na PCR de colônia foram sequenciados para a verificação da presença do inserto e da fase de leitura correta. A construção obtida foi denominada LALP3/SUMO.

Por conseguinte a construção LALP3/SUMO foi transformada em cepas de *E. coli* SHuffle T7 Express LysY competente (New England Biolabs), BL21 (DE3) pLysS competente (Invitrogen) e BL21 Star (DE3) One Shot (Invitrogen) por choque térmico. Após a transformação, as bactérias da cepa SHuffle T7 Express LysY (New England Biolabs) foram plaqueadas em meio LB ágar (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L, agar-ágar 15g/L) contendo kanamicina (50 μ g/ml) e incubadas por 16 horas a 30°C em estufa B.O.D. As bactérias da cepa BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen) foram plaqueadas em meio LB ágar (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L, agar-ágar 15g/L) contendo kanamicina (50 μ g/mL) e cloranfenicol (34 μ g/mL) e incubadas por 16 horas a 37°C em estufa B.O.D. As bactérias da cepa BL21 Star (DE3) One Shot (Invitrogen) foram plaqueadas em meio LB ágar (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L, agar-ágar 15g/L) contendo kanamicina (50mg/ml) e incubadas por 16 horas a 37°C em estufa B.O.D. As condições experimentais utilizadas para a subclonagem seguem os mesmos padrões utilizados para a obtenção da construção em vetor pGEM-T (descritos nos itens 4.3 – 4.12 de Material e Métodos). Protocolo adaptado de Trevisan-Silva *et al.* (2010) e da Silveira *et al.* (2007).

4.15 Cepas de *E. coli* utilizadas para teste de mini-expressão e expressão em larga escala da LALP3

Os testes de mini-expressão e as expressões em larga escala foram realizadas utilizando diferentes cepas de *E. coli* com propriedades distintas para auxiliar na obtenção da proteína recombinante. As cepas utilizadas foram:

- SHuffle T7 Express LysY (New England Biolabs), a qual apresenta condições citoplasmáticas menos redutoras e expressa a chaperona DsbC (*Dissulphide Bond Isomerase*) para auxiliar no dobramento das proteínas recombinantes e facilitar a formação de pontes dissulfeto (BESSETTE *et al.*, 1999; QIU *et al.*, 1998).

- BL21 (DE3) pLysS (Promega), a qual possui um sistema de expressão controlado pelo promotor T7 e promove a inibição da expressão basal da proteína recombinante devido à expressão da lisozima T7 (DAVANLOO *et al.*, 1984; STUDIER e MOFFATT, 1986);

- BL21 Star (DE3) One Shot (Invitrogen), a qual confere maior estabilidade às moléculas de RNA e conseqüentemente promove o aumento na expressão de proteínas recombinantes devido à uma mutação no gene que codifica para a RNaseE (LOPEZ *et al.*, 1999; LEROY *et al.*, 2002).

4.16 Testes de mini-expressão da construção LALP3/pET20b+

A partir das placas contendo os clones transformados, foram realizados pré-inóculos em meio LB (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L e NaCl 10g/L) e em meio Triptona-Fosfato (triptona 20g/L, extrato de levedura 15g/L, NaCl 8g/L, Na₂HPO₄ 2g/L, KH₂PO₄ 1g/L e glicose 0,2%) contendo ampicilina (100µg/mL). As amostras foram incubadas por 16 horas a 30°C sob agitação constante de 200rpm. Após o crescimento das culturas bacterianas, foram realizados inóculos a partir dos pré-inóculos utilizando a razão 1:100 (cultura do pré-inóculo:meio para inóculo). As amostras foram incubadas a 30°C sob agitação constante de 200rpm. Após as culturas atingirem absorvância em 600nm=0,5; foram utilizadas diferentes concentrações do indutor Isopropil β-D-thiogalactopiranosídeo (IPTG). Foram utilizadas diferentes concentrações do indutor Isopropil β-D-thiogalactopiranosídeo (IPTG), sendo elas 0,05mM,

0,1mM e 0,5mM em meio LB (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L e NaCl 10g/L) com ampicilina (100µg/mL); e 0,05mM, 0,1mM e 0,5mM em meio Triptona-Fosfato (triptona 20g/L, extrato de levedura 15g/L, NaCl 8g/L, Na₂HPO₄ 2g/L, KH₂PO₄ 1g/L e glicose 0,2%) com ampicilina (100µg/mL). A indução da expressão da toxina foi realizada por 4 horas, sendo que a cada hora foram coletadas amostras de 1mL para posterior análise em gel de acrilamida. As amostras coletadas nos tempos 0 (início da indução), 1 hora, 2 horas, 3 horas e 4 horas foram centrifugadas por 3 minutos a 4000xg. O sobrenadante foi retirado e o precipitado resultante foi congelado a -20°C. Após as 4 horas de expressão as culturas foram resfriadas em banho de água/gelo e centrifugadas por 9 minutos a 7000xg. Os precipitados foram ressuspensos em tampão de ligação (NaH₂PO₄ 50mM - pH 8.0, NaCl 500mM, imidazol 10mM) e as amostras foram incubadas com lisozima (Merck) 1mg/ml por 30 minutos a 4°C. Por fim as amostras foram submetidas à lise mecânica em prensa *French Press* (4 ciclos a 1000psi cada) e então centrifugadas a 14000xg por 30 minutos. O sobrenadante foi separado do precipitado e ambos foram mantidos a 4°C.

Testes de mini-expressão com menor temperatura foram realizados, onde efetuou-se os pré-inóculos em meio Triptona-Fosfato (triptona 20g/L, extrato de levedura 15g/L, NaCl 8g/L, Na₂HPO₄ 2g/L, KH₂PO₄ 1g/L e glicose 0,2%) contendo ampicilina (100mg/ml) e as amostras foram incubadas a 30°C por 16 e 24 horas sob 200rpm. Para os inóculos foi utilizado o mesmo meio e antibiótico na razão 1:100 (cultura do pré-inóculo: meio para incóculo), e as amostras foram incubadas a 20°C a 200rpm. Após as culturas atingirem a densidade em 600nm=0,5, a indução da expressão foi realizada com 0,5mM de Isopropil β-D-thiogalactopiranosídeo (IPTG). A expressão se deu por 16 horas e 24 horas a 20°C, de modo que foram retiradas alíquotas de 1mL nos tempos 0 (início da indução) e 16 horas e 24 horas após a indução. Estas foram centrifugadas por 3 minutos a 4000xg. O sobrenadante de cada expressão foi retirado e o precipitado resultante foi congelado a -20°C. Após o tempo de expressão as culturas foram resfriadas em banho de água/gelo e centrifugadas por 9 minutos a 7000xg. Os precipitados foram ressuspensos em tampão de ligação (NaH₂PO₄ 50mM - pH 8.0, NaCl 500mM, imidazol 10mM) e as amostras foram incubadas com lisozima (Merck) 1mg/ml por 30

minutos a 4°C. Por fim as amostras foram submetidas à lise mecânica em prensa *French Press* (4 ciclos a 1000psi cada) e então centrifugadas a 14000xg por 30 minutos. O sobrenadante foi separado do precipitado e ambos foram mantidos a 4°C. Adaptado de da Silveira *et al.* (2007b).

4.17 Testes de mini-expressão da construção LALP3/SUMO

A partir das placas contendo os clones transformados, foram realizados pré-inóculos em meio Triptona-Fosfato (triptona 20g/L, extrato de levedura 15g/L, NaCl 8g/L, Na₂HPO₄ 2g/L, KH₂PO₄ 1g/L e glicose 0,2%) contendo kanamicina (50µg/mL) para as cepas SHuffle T7 Express LysY (New England Biolabs) e BL21 Star (DE3) One Shot (Invitrogen); e kanamicina (50µg/mL) e cloranfenicol (34µg/mL) para a cepa BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen). As amostras foram incubadas por 16 horas a 30°C (SHuffle) e 37°C (BL21 e BL21 Star) sob agitação constante de 200rpm. Após o crescimento das culturas bacterianas, foram realizados inóculos a partir dos pré-inóculos utilizando a razão 1:100 (cultura do pré-inóculo:meio para inóculo). As amostras foram incubadas a 30°C (SHuffle) e 37°C (BL21 e BL21 Star) sob agitação constante de 200rpm. Após as culturas atingirem absorvância em 600nm=0,5; foram utilizadas diferentes concentrações do indutor Isopropil β-D-thiogalactopiranosídeo (IPTG). Foram utilizadas as concentrações de: 0,05mM; 0,1mM; 0,5mM; 1mM e 2mM do indutor nos testes de mini-expressão realizados com a cepa SHuffle T7 Express LysY (New England Biolabs); 0,1mM; 0,5mM; 1mM e 2mM do indutor nos testes realizados com a cepa BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen); e 0,05mM; 0,1mM e 0,5mM do indutor nos testes realizados com a cepa BL21 Star (DE3) One Shot (Invitrogen).

A indução da expressão da proteína recombinante foi realizada a 30°C por 4 horas para todas as cepas utilizadas, sendo que a cada hora foram coletadas amostras de 1mL para posterior análise em gel de poliacrilamida. As amostras coletadas nos tempos 0 (início da indução), 1 hora, 2 horas, 3 horas e 4 horas foram centrifugadas por 3 minutos a 4000xg. O sobrenadante foi retirado e o precipitado resultante foi congelado a -20°C. Após as 4 horas de expressão as culturas foram resfriadas em banho de água/gelo e centrifugadas por 9 minutos a 7000xg. Os precipitados foram ressuspensos em tampão de

ligação (NaH_2PO_4 50mM - pH 8.0, NaCl 500mM, imidazol 10mM) e as amostras foram incubadas com lisozima (Merck) 1mg/ml por 30 minutos a 4°C. Por fim as amostras foram submetidas à lise mecânica em prensa *French Press* (4 ciclos a 1000psi cada) e então centrifugadas a 14000xg por 30 minutos. O sobrenadante foi separado do precipitado e ambos foram mantidos a 4°C.

Testes de mini-expressão com menor temperatura foram realizados utilizando as cepas SHuffle T7 Express LysY (New England Biolabs) e BL21 Star (DE3) One Shot (Invitrogen). Para cada cepa, efetuou-se um pré-inóculo em meio Triptona-Fosfato (triptona 20g/L, extrato de levedura 15g/L, NaCl 8g/L, Na_2HPO_4 2g/L, KH_2PO_4 1g/L e glicose 0,2%) contendo kanamicina (50mg/ml) e as amostras foram incubadas a 30°C (SHuffle T7 Express LysY) e 37°C (BL21 Star Star (DE3) One Shot) por 16 horas sob 200rpm. Para cada inóculo foi utilizado o mesmo meio e antibiótico na razão 1:100 (cultura do pré-inóculo:meio para incóculo), e as amostras foram incubadas a 30°C (SHuffle T7 Express LysY) e 37°C (BL21 Star (DE3) One Shot) a 200rpm. Após cada cultura atingir absorbância em 600nm=0,5, as culturas foram separadas em duas partes e a indução da expressão foi realizada com 0,05mM e 0,1mM de Isopropil β -D-thiogalactopiranosídeo (IPTG) para ambas as cepas utilizadas. A expressão se deu por 16 horas a 20°C, de modo que foram retiradas alíquotas de 1mL nos tempos 0 (início da indução) e 16h após a indução. Estas foram centrifugadas por 3 minutos a 4000xg. O sobrenadante foi retirado e o precipitado resultante foi congelado a -20°C. Após as 16 horas de expressão as culturas foram resfriadas em banho de água/gelo e centrifugadas por 9 minutos a 7000xg. Os precipitados foram ressuspensos em tampão de ligação (NaH_2PO_4 50mM - pH 8.0, NaCl 500mM, imidazol 10mM) e as amostras foram incubadas com lisozima (Merck) 1mg/ml por 30 minutos a 4°C. Por fim as amostras foram submetidas à lise mecânica em prensa *French Press* (4 ciclos a 1000psi cada) e então centrifugadas a 14000xg por 30 minutos. O sobrenadante foi separado do precipitado e ambos foram mantidos a 4°C.

Adaptado de da Silveira *et al.* (2007b).

4.18 Expressão em larga escala da construção LALP3/SUMO em cepa *E. coli* SHuffle T7 Express LysY

Seguindo as condições utilizadas nos testes de mini-expressão descritos no item 4.17 em Material e Métodos, foi realizada a expressão da proteína recombinante utilizando a cepa de *E. coli* SHuffle T7 Express LysY (New England Biolabs). A partir da placa contendo os clones transformados, foi realizado um pré-inóculo em 1L de meio Triptona-Fosfato (triptona 20g/L, extrato de levedura 15g/L, NaCl 8g/L, Na₂HPO₄ 2g/L, KH₂PO₄ 1g/L e glicose 0,2%) contendo kanamicina (50µg/mL). A amostra foi incubada por 16 horas a 30°C sob agitação constante de 200rpm. Após o crescimento da cultura bacteriana, foi realizado um inóculo a partir do pré-inóculo anterior utilizando a razão 1:100 (cultura do pré-inóculo:meio para inóculo). A amostra foi incubada a 30°C sob agitação constante de 200rpm. Após a cultura atingir ABSORBÂNCIA EM 600NM₆₀₀= 0,5; A indução da expressão da proteína recombinante foi realizada utilizando 1mM de Isopropil β-D-thiogalactopiranosídeo (IPTG) a 30°C por 4 horas. Foram coletadas amostras nos tempos 0 (início da indução) e 4 horas (tempo induzido), as quais foram centrifugadas por 3 minutos a 4000xg. O sobrenadante de cada amostra foi retirado e o precipitado resultante foi congelado a -20°C. Após as 4 horas de expressão a cultura foi resfriada em banho de água/gelo e centrifugada por 9 minutos a 7000xg. O precipitado foi ressuspendido em tampão de ligação (NaH₂PO₄ 50 mM - pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM) e a amostra foi incubada com lisozima (Merck) 1mg/ml por 30 minutos a 4°C. Após a amostra foi submetida à lise mecânica em prensa *French Press* (4 ciclos a 1000psi cada) e então centrifugada a 14000xg por 30 minutos. O sobrenadante foi separado do precipitado e ambos foram mantidos a 4°C. Adaptado de da Silveira *et al.* (2007b).

4.19 Expressão em larga escala da construção LALP3/SUMO em cepa *E. coli* BL21 STAR (DE3) One Shot

Seguindo as condições utilizadas nos testes de mini-expressão descritos no item 4.19 em Material e Métodos, foi realizada a expressão da proteína recombinante utilizando a cepa de *E. coli* BL21 STAR (DE3) One Shot (Invitrogen). A partir da placa contendo os clones transformados, foi realizado um pré-inóculo em meio Triptona-Fosfato (triptona 20g/L, extrato de levedura 15g/L, NaCl 8g/L, Na₂HPO₄ 2g/L, KH₂PO₄ 1g/L e glicose 0,2%) contendo kanamicina (50µg/mL). A amostra foi incubada por 16 horas a 37°C sob agitação constante de 200rpm. Após o crescimento da cultura bacteriana, foi realizado um inóculo a partir dos pré-inóculo anterior utilizando a razão 1:100 (cultura do pré-inóculo:meio para inóculo). A amostra foi incubada a 37°C sob agitação constante de 200rpm. Após a cultura atingir absorbância em 600nm=0,5; A indução da expressão da proteína recombinante foi realizada utilizando 0,05mM de Isopropil β-D-thiogalactopiranosídeo (IPTG) e duas condições de temperatura: 30°C e 37°C, por 4 horas. Foram coletadas amostras nos tempos 0 (início da indução) e 4h (tempo induzido), as quais foram centrifugadas por 3 minutos a 4000xg. O sobrenadante de cada amostra foi retirado e o precipitado resultante foi congelado a -20°C. Após as 4 horas de expressão cada cultura foi resfriada em banho de água/gelo e centrifugada por 9 minutos a 7000xg. O precipitado obtido após a expressão a 30°C foi ressuscitado em tampão de ligação (NaH₂PO₄ 50mM - pH 8.0, NaCl 500mM, imidazol 10mM) contendo o inibidor de cisteíno-proteases Iodoacetamida 10mM e a amostra foi incubada com lisozima (Merck) 1mg/ml por 30 minutos a 4°C. O precipitado obtido após a expressão a 37°C foi ressuscitado em tampão de ligação desnaturante (ureia 8M, NaH₂PO₄ 50mM - pH 8.0, NaCl 500mM, imidazol 10mM) contendo o inibidor de cisteíno-proteases Iodoacetamida 10mM e a amostra foi incubada com lisozima (Merck) 1mg/ml por 30 minutos a 4°C.

Após as amostras foram submetidas à lise mecânica em prensa *French Press* (4 ciclos a 1000psi cada) e então centrifugadas a 14000xg por 30 minutos. O sobrenadante referente a cada expressão foi separado do

precipitado e ambos foram mantidos a 4°C. Adaptado de da Silveira e colaboradores (2007b).

4.20 Análise dos testes de mini-expressão e das expressões em larga escala por eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida

A fim de analisar os resultados das mini-expressões da LAP3/pET20b+ e LALP3/SUMO e expressões em larga escala da LALP3/SUMO, eletroforeses foram realizadas em géis de poliacrilamida (12,5%) contendo detergente aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) sob condições redutoras (contendo 5% de β -mercaptoetanol). Os géis foram preparados utilizando o aparato comercial Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad). A solução de poliacrilamida, contendo os catalisadores APS e TEMED, foi colocada entre placas de vidro e isolada com uma camada de isobutanol. Após a polimerização, foi removida a camada de água e isobutanol acima do gel com auxílio de papel filtro. A solução de empacotamento, contendo 5% de poliacrilamida e os catalisadores, foi colocada acima do gel e nela foi posicionado o pente para formação dos poços. Após a polimerização, o pente foi removido e os poços secos com auxílio de papel filtro. A separação das proteínas foi obtida mediante aplicação de corrente de 25mA constante, até a separação total das proteínas. Os géis foram corados em solução contendo Azul de Coomassie Brilhante R-250 (Amresco) 0,25%, metanol 50% e ácido acético 10% em água deionizada, durante 10 minutos à temperatura ambiente sob agitação constante. A descoloração foi realizada com metanol 50% em água deionizada, com sucessivas trocas da solução de metanol. Em seguida, os géis foram observados sob luz branca e fotodocumentados em *scanner* Epson Perfection 3490 Photo.

4.21 Imunoensaios de *Western Blotting*

Visando a confirmação da LALP3/SUMO na condição solúvel foram realizados imunoensaios de *Western Blotting*. Amostras das culturas bacterianas foram submetidas à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE) e as proteínas foram transferidas para membranas de

nitrocelulose por 1h a 100V. Em seguida as membranas foram bloqueadas por 2h com leite desnatado em pó diluído Molico® (Nestlé) em PBS (NaCl 100mM; NaH₂PO₄ 10mM - pH 7,4) 1% (p/v). Os anticorpos primários α -His tag, que reconhecem a etiqueta de 6 histidinas inserida na proteína recombinante (General Electric), e α -LALP, que reconhecem epítomos de metaloproteases do tipo astacina de veneno de *L. intermedia* foram diluídos (1:3000 e 1:1000 respectivamente) na mesma solução de bloqueio na proporção. As membranas de nitrocelulose foram incubadas nesta solução por 2h à temperatura ambiente sob constante agitação. As membranas foram lavadas com o mesmo tampão na ausência de anticorpo e incubadas com anticorpos secundários IgG (α -IgG de camundongos, que reconhecem o α -His tag, e α -IgG de coelhos, que reconhecem o α -LALP, nas diluições de 1:10000 e 1:8000 respectivamente) e conjugados com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) por 1h à temperatura ambiente. Após lavagens, foi realizada a revelação por meio da reação utilizando o substrato BCIP e o cromógeno NBT (Promega) em tampão ótimo para atividade de fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM - pH 9,5; NaCl 100 mM e MgCl₂ 5 mM). Adaptado de da Silveira *et al.* (2007b).

4.22 Purificação da proteína recombinante LALP3/SUMO

A purificação da toxina recombinante foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando resina de Ni-NTA Agarose (QIAGEN) sob condições nativa e desnaturante.

- **Purificação nativa:** Após a lise da cultura bacteriana o sobrenadante obtido foi incubado com 150 μ L da resina por 1 hora a 4°C sob agitação de 6rpm. A suspensão foi empacotada em coluna plástica e lavada exaustivamente com tampão de lavagem (NaH₂PO₄ 50mM - pH 8.0, NaCl 500mM, imidazol 20mM), monitorando-se a absorbância em 280nm durante todo o procedimento de purificação. Após a absorbância em 280nm ter atingido o valor 0,01; a eluição da proteína recombinante foi realizada com tampão de eluição (NaH₂PO₄ 50mM - pH 8.0, NaCl 500mM, imidazol 250mM). O grau de pureza do produto eluído (eluato) foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% sob condições redutoras (SDS-PAGE) e o produto da eluição obtido foi dializado contra PBS (NaCl 100mM; NaH₂PO₄ 10mM - pH

7,4) por 16 horas a 4°C, seguido de duas trocas de 2 horas sob as mesmas condições anteriores. A suspensão da proteína solúvel foi quantificada por espectrofotometria com absorbância em 280nm considerando a concentração de 1mg/ml de LALP3/SUMO quando a absorbância em 280nm apresentar valor de 0,761 segundo os parâmetros físico-químicos determinados com o uso da ferramenta ProtParam utilizando as condições padrões do programa, disponível no site <http://web.expasy.org/protparam/>. Protocolo adaptado de da Silveira *et al.* (2007b) e Chaim *et al.* (2006).

- **Purificação desnaturante:** A purificação desnaturante foi realizada apenas para a amostra LALP3/SUMO. Após a lise da cultura bacteriana o sobrenadante obtido foi incubado com 150µL da resina por 2 horas a 4°C sob agitação de 6rpm. A suspensão foi empacotada em coluna plástica e lavada exaustivamente com tampão de lavagem desnaturante (ureia 8M, NaH₂PO₄ 50mM - pH 6.0, NaCl 500mM, imidazol 20mM), monitorando-se a absorbância em 280nm durante todo o procedimento de purificação. Após a absorbância em 280nm ter atingido o valor 0,01; a eluição da proteína recombinante foi realizada com tampão de eluição desnaturante (ureia 8M, NaH₂PO₄ 50mM - pH 4.0, NaCl 500mM, imidazol 250mM). O grau de pureza do produto eluído (eluato) foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% sob condições redutoras (SDS-PAGE) e o produto da eluição desnaturado foi dializado contra PBS (NaCl 100mM; NaH₂PO₄ 10mM - pH 7,4) por 16 horas a 4°C, seguido de duas trocas de 2 horas sob as mesmas condições anteriores. A suspensão da proteína solúvel foi quantificada por espectrofotometria com absorbância em 280nm considerando a concentração de 1mg/mL de LALP3 madura fusionada à proteína SUMO quando a absorbância em 280nm apresentar valor de 0,761 segundo os parâmetros físico-químicos determinados com o uso da ferramenta ProtParam utilizando as condições padrões do programa, disponível no site <http://web.expasy.org/protparam/>. Protocolo adaptado de da Silveira *et al.* (2007b) e Chaim *et al.* (2006).

Após cada procedimento de purificação, a proteína recombinante obtida foi analisada por SDS-PAGE 12,5% sob condições redutoras (contendo 5% de β-mercaptoetanol) e não redutoras (sem β-mercaptoetanol). O preparo dos géis e coloração e descoloração dos mesmos foi realizado como descrito no item 4.20 de Material e Métodos.

4.23 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Azul de Coomassie, adaptado para leitura em leitor de placas de 96 *wells* (Meridian ELX 800). O método baseia-se na diferença de coloração em que o Azul de Coomassie pode se encontrar. Ao ligar-se a proteínas, o reativo passa da coloração vermelha para azul, sendo sua absorbância determinada em 595nm. A curva padrão foi construída com diferentes quantidades (0,25µg – 2,00µg) de Soro de Albumina Bovina (BSA) e as amostras foram diluídas para entrarem na região de linearidade da curva. O volume total de cada ponto da curva e das amostras foi de 20µL. O reativo para dosagem de proteínas Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) foi diluído adicionando uma parte do reativo em 4 partes de água. Foram adicionados 200µL do reativo diluído em cada ponto da curva e nas amostras, e após 5 minutos de incubação foi determinada a absorbância em 595nm. Os pontos da curva e as amostras foram lidos em duplicatas, sendo que o coeficiente de determinação aceitável da curva de BSA foi $R^2 > 0,99$. Protocolo adaptado de Bradford (1976).

4.24 Avaliação da atividade fibrinogenolítica da LALP3/SUMO expressa em SHuffle T7 Express LysY

Para a avaliação da atividade proteolítica da LALP3/SUMO, foi realizado um ensaio de degradação de fibrinogênio. Para tanto o fibrinogênio (Sigma-Aldrich) foi incubado com a proteína recombinante obtida após a expressão em *E. coli* SHuffle T7 Express LysY na razões enzima:substrato de 1:1 e 1:2,5.

Como controle negativo foram criadas três condições onde o fibrinogênio foi incubado com: PBS (NaCl 100mM; NaH₂PO₄ 10mM - pH 7,4) no primeiro grupo, veneno de *L. intermedia* (5µg) na razão 1:2,5 veneno:substrato na presença do inibidor 1,10-fenantrolina 10mM no segundo grupo, e fosfolipase 1 recombinante de *L. intermedia* (5µg) na razão de 1:2,5 enzima:substrato no terceiro grupo. A adição de fibrinogênio ao grupo em que foi utilizado o inibidor 1,10-fenantrolina foi realizada após 30 minutos da adição dos outros reagentes, visando a total inibição das enzimas do veneno.

Como controle positivo o fibrinogênio foi incubado com o veneno de *L. intermedia* (5µg) na razão 1:2,5 veneno:substrato.

As amostras foram incubadas a 37°C por 16 horas em estufa do tipo B.O.D. (Nova Ética). Após o tempo de incubação, as amostras analisadas em SDS-PAGE 5% sob condições redutoras (contendo 5% de β-mercaptoetanol). O preparo dos géis e coloração e descoloração dos mesmos foi realizado como descrito no item 4.20 de Material e Métodos. Protocolo adaptado de da Silveira *et al.* (2007b).

4.25 Ensaio de atividade da LALP3/SUMO sobre azocaseína cromogênica

Para a avaliação da atividade proteolítica da LALP3/SUMO, foi realizado um ensaio piloto de degradação da azocaseína cromogênica. Para tanto a proteína recombinante obtida após a expressão em *E. coli* SHuffle T7 Express LysY foi incubada com a azocaseína (Sigma-Aldrich) na razões enzima:substrato de 1:12,5; 1:6,25 e 1:3,125. De maneira semelhante, um segundo grupo teste foi gerado onde a proteína recombinante foi incubada com azocaseína nas mesmas condições anteriores com a adição do inibidor 1,10-fenantrolina 10mM.

Como controle de reação a azocaseína foi incubada com tripsina (Sigma-Aldrich) na razão enzima:substrato de 1:12,5.

Como controle negativo foram criadas duas condições onde a azocaseína foi incubada com: PBS (NaCl 100mM; NaH₂PO₄ 10mM - pH 7,4) no primeiro grupo, e veneno de *L. intermedia* (5µg) na razão veneno:substrato 1:12,5 na presença do inibidor 1,10-fenantrolina 10mM no segundo grupo.

Como controle positivo a azocaseína foi incubada com: veneno de *L. intermedia* (20µg) na razão 1:12,5 veneno:substrato.

As amostras foram incubadas a 37°C por 16 horas em estufa do tipo B.O.D. (Nova Ética). Após o tempo de incubação a reação foi interrompida com a adição de ácido acético 20% na razão de 1:1 (v/v). As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 6000xg, o sobrenadante foi coletado e ao mesmo foi adicionado NaOH para a concentração final de 300mM. As amostras foram transferidas em triplicatas para placas *multiwell* de 96 poços e as absorbâncias foram obtidas através de leitura em espectrofotômetro com absorção em

comprimento de onda de 450nm. Adaptado de Lee *et al.* (2007) e Yang *et al.* (2007).

4.26 Ensaio de atividade da LALP3/SUMO sobre colágeno tipo I desnaturado

Para a avaliação da atividade proteolítica da LALP3/SUMO, foi realizado um ensaio de degradação de colágeno tipo I desnaturado. Para tanto o colágeno tipo I (Sigma-Aldrich) previamente desnaturado por temperatura (98°C por 10 minutos) foi incubado com a proteína recombinante obtida após a expressão em *E. coli* SHuffle T7 Express LysY nas razões enzima:substrato de 1:5 e 1:2. De maneira semelhante, mais três grupos teste foram gerados onde o colágeno tipo I desnaturado foi incubado com: a proteína recombinante na razão enzima:substrato de 1:2 na presença de inibidores (1,10-fenantrolina 10mM, EDTA 10mM e EGTA 10mM) no primeiro grupo, a proteína recombinante na razão enzima:substrato de 1:2 na presença de ZnSO₄ 50µM no segundo grupo, e proteína recombinante na razão enzima:substrato de 1:2 na presença de CaCl₂ 50µM no terceiro grupo.

Como controle negativo foram criadas cinco condições onde o colágeno tipo I desnaturado foi incubado com: PBS (NaCl 100mM; NaH₂PO₄ 10mM - pH 7,4) no primeiro grupo, PBS (NaCl 100mM; NaH₂PO₄ 10mM - pH 7,4) na presença de inibidores (1,10-fenantrolina 10mM, EDTA 10mM e EGTA 10mM) no segundo grupo, PBS (NaCl 100mM; NaH₂PO₄ 10mM - pH 7,4) na presença de ZnSO₄ 50µM e CaCl₂ 50µM no terceiro grupo, veneno de *L. intermedia* (3µg) na razão 1:5 veneno:substrato na presença de inibidores (1,10-fenantrolina 10mM, EDTA 10mM e EGTA 10mM) no quarto grupo, e fosfolipase 1 recombinante de *L. intermedia* (3µg) na razão de 1:5 enzima:substrato no quinto grupo. A adição de colágeno tipo I desnaturado aos grupos em que foram utilizados inibidores foi realizada após 30 minutos da adição dos outros reagentes, visando a total inibição da enzima recombinante e do veneno.

Como controle positivo o colágeno tipo I desnaturado foi incubado com o veneno de *L. intermedia* (3µg) na razão 1:5 veneno:substrato.

As amostras foram incubadas a 37°C por 16 horas em estufa do tipo B.O.D. (Nova Ética). Após o tempo de incubação, as amostras analisadas em

SDS-PAGE 5% sob condições redutoras (contendo 5% de β -mercaptoetanol). O preparo dos géis e coloração e descoloração dos mesmos foi realizado como descrito no item 4.20 de Material e Métodos. Adaptado de Veiga *et al.* (2000b) e Veiga *et al.* (2001a).

5.0 RESULTADOS

5.1 Predição da estrutura tridimensional da LALP3 madura

A predição da estrutura tridimensional da LALP3 madura foi realizada através da modelagem com o auxílio do servidor Swiss-Model utilizando como modelo o cristal do peptídeo maduro de *Astacus astacus* com resolução de 1.8Å (GOMIS-RUTH *et al.*, 1993) depositado no Banco de Dados de Proteínas (PDB:1AST). O modelo obtido apresenta 30,8% de identidade com o cristal da astacina. A modelagem evidenciou a possível conformação riniforme do peptídeo, com dois domínios separados pela fenda catalítica e presença de estruturas secundárias em alfa-hélice e beta-folha (Figura 10 A e B). Uma vez que o sítio catalítico da família das metaloproteases do tipo astacina é conservado, foi possível visualizar o possível perfil da fenda catalítica da LALP3 madura, bem como os resíduos de aminoácidos que interagem com o íon zinco, determinante para a atividade da enzima (Figura 11 A e B).

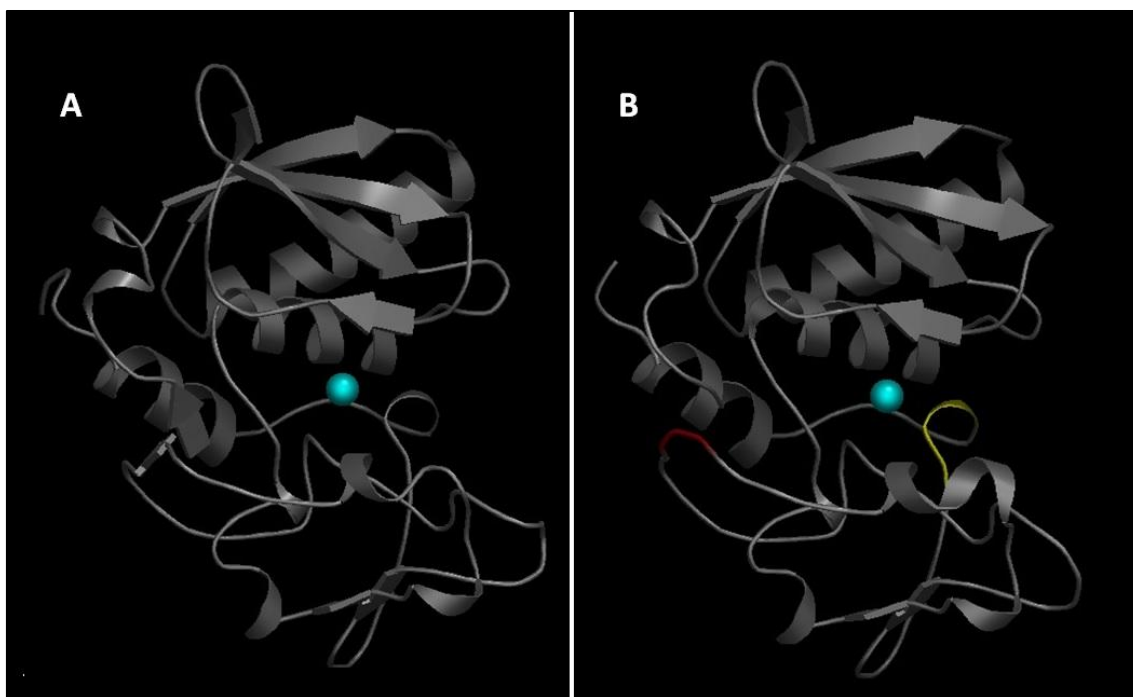


FIGURA 10 – PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LALP3. (A) Estrutura da astacina de *A. astacus* utilizada com resolução de 1.8Å utilizada como molde para a geração dos modelos das metaloproteases do tipo astacina de *Loxosceles intermedia*. Em (B) está representada a predição da estrutura da LALP3 com possível conformação riniforme. A esfera em azul representa o íon zinco integrando o sítio catalítico das enzimas e os loops em vermelho e amarelo representam os possíveis sítios de N-glicosilação (NNT e NAS). Análise realizada no programa Open Astex Viewer.

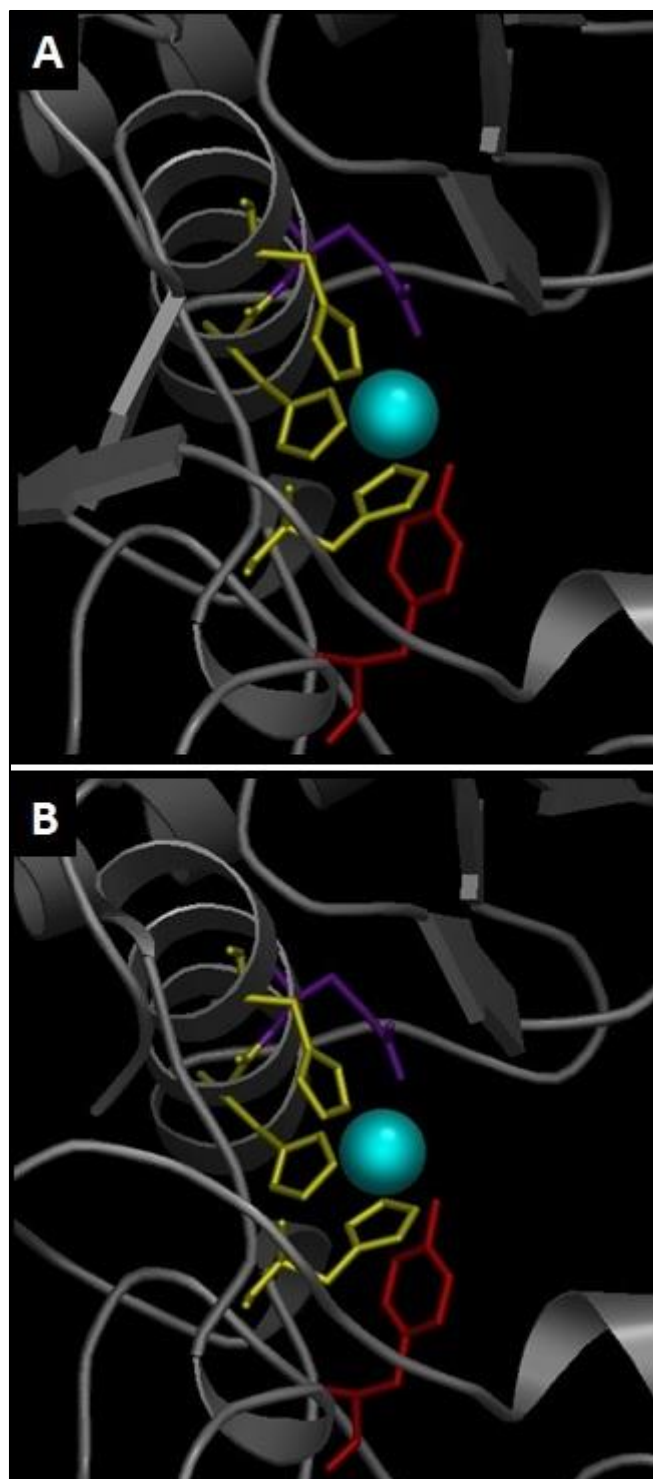


FIGURA 11 – PREDIÇÃO DA ESTRUTURA DO SÍTIO CATALÍTICO DA LALP3. (A) Estrutura da astacina de *A. astacus* evidenciando os aminoácidos que participam da estabilização do íon zinco no sítio catalítico. Em amarelo estão representadas as histidinas 92, 96 e 102. Em roxo está representado o ácido glutâmico 93 e em vermelho a tirosina 149. A esfera azul representa o íon zinco. Em (B) está representada a predição da estrutura da LALP3 com o sítio catalítico em detalhe, demonstrando o mesmo padrão de aminoácidos que interagem com o íon zinco. Análise realizada no programa Open Astex Viewer.

5.1 Clonagem da sequência da LALP3 madura em vetor de clonagem pGEM-T

Em uma análise da sequência aminoacídica deduzida da proteína, Trevisan-Silva *et al.* (2010) demonstraram que o precursor da toxina LALP3 é constituído de 243 resíduos de aminoácidos, sendo que o peptídeo sinal e pró-peptídeo possuem respectivamente 24 e 19 resíduos. Por sua vez o peptídeo maduro é constituído de 200 resíduos de aminoácidos (Figura 12).

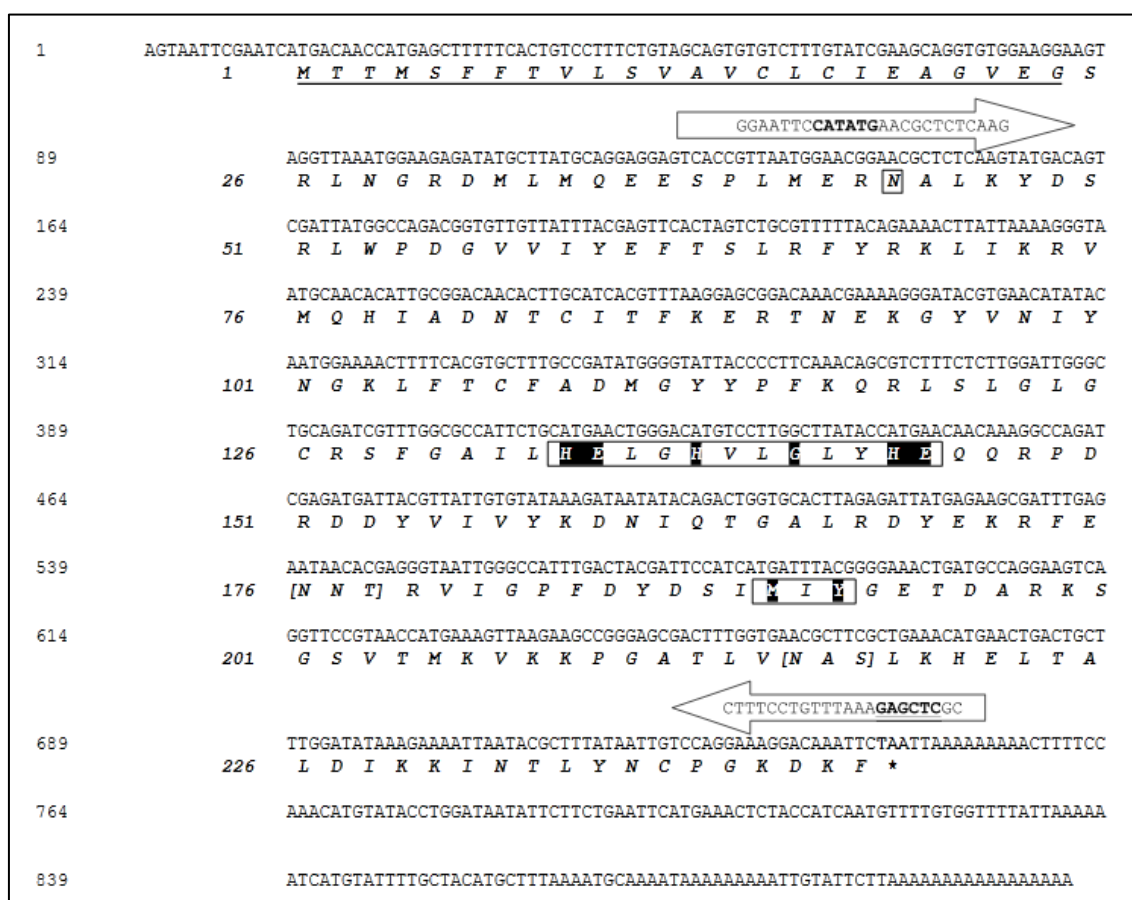


FIGURA 12 – SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA E DEDUÇÃO DA SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA DA LALP3. O peptídeo sinal predito está sublinhado na sequência da proteína. A posição dos oligonucleotídeos utilizados para a clonagem da LALP3 em pGEM-T e subclonagem em pET20b+ estão representados pelas flechas. A asparagina representada dentro da caixa representa o primeiro aminoácido da LALP3 madura. O motivo de ligação ao zinco (HELGHVLGLYHE) e volta de metionina (MIY), ambos assinaturas da família das astacinas, estão representados na sequência. Entre colchetes estão os dois possíveis sítios de N-glicosilação (NNT e NAS). O asterisco representa o códon de parada (TAA).

Visando a obtenção da sequência de cDNA que codifica para a LALP3 madura (ausência de pré e pró-peptídeos), foi realizada uma minipreparação de plasmídeos da biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de *L.*

intermedia, e em seguida uma reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando a enzima Pfu DNA Polimerase, a qual possui como característica a alta fidelidade na inserção de desoxiribonucleotídeos. Foram utilizados os oligonucleotídeos gene-específicos *sense* (5'-GGAATTCCATATGAACGCTCTCAAG-3') e *antisense* (3'-CCGCTCGAGAAATTTGTCCTTTC-5'). O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% e após a exposição do gel à luz negra com emissão de luz em comprimento de onda de 380nm foi observada uma banda na altura de aproximadamente 600pb, confirmando a amplificação do fragmento referente à sequência da LALP3 madura. A banda visualizada foi excisada do gel e purificada utilizando o protocolo de gel purificação do kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (General Electric). A leitura espectrofotométrica da amostra (A260/280) após a purificação apresentou valor $\geq 1,8$, caracterizando grau de pureza elevado, desta forma possibilitando a clonagem.

Visando a clonagem da sequência da LALP3 madura em vetor de clonagem pGEM-T Easy Vector, foi realizada a adenilação das extremidades 3'-OH do fragmento obtido após a gel purificação em uma reação utilizando a Taq DNA Polimerase e nucleotídeos de adenina. O produto desta reação foi analisado após a eletroforese em gel de agarose de 1,5%. O gel foi exposto à luz negra e a banda presente foi visualizada na altura de aproximadamente 600pb. A banda foi extraída do gel e uma nova gel-purificação e leitura espectrofotométrica utilizando as mesmas condições mencionadas anteriormente foram realizadas.

O inserto contendo as extremidades 3'-OH adeniladas foi ligado ao vetor de clonagem pGEM-T Easy Vector utilizando a enzima T4 DNA ligase. O produto de ligação foi precipitado e a construção foi transformada em *E. coli* DH5 α eletrocompetente por eletroporação. Em seguida foi realizado um ensaio de alfa-complementação onde se verificou a presença de colônias brancas (positivas) na placa onde cresceram as bactérias. Ainda, para confirmar a positividade dos clones obtidos foi realizada uma PCR de colônias onde 28 clones foram selecionados aleatoriamente da placa. Ao analisar o produto da PCR em gel de agarose 1,5% foram constatados 11 clones positivos (Figura 13).

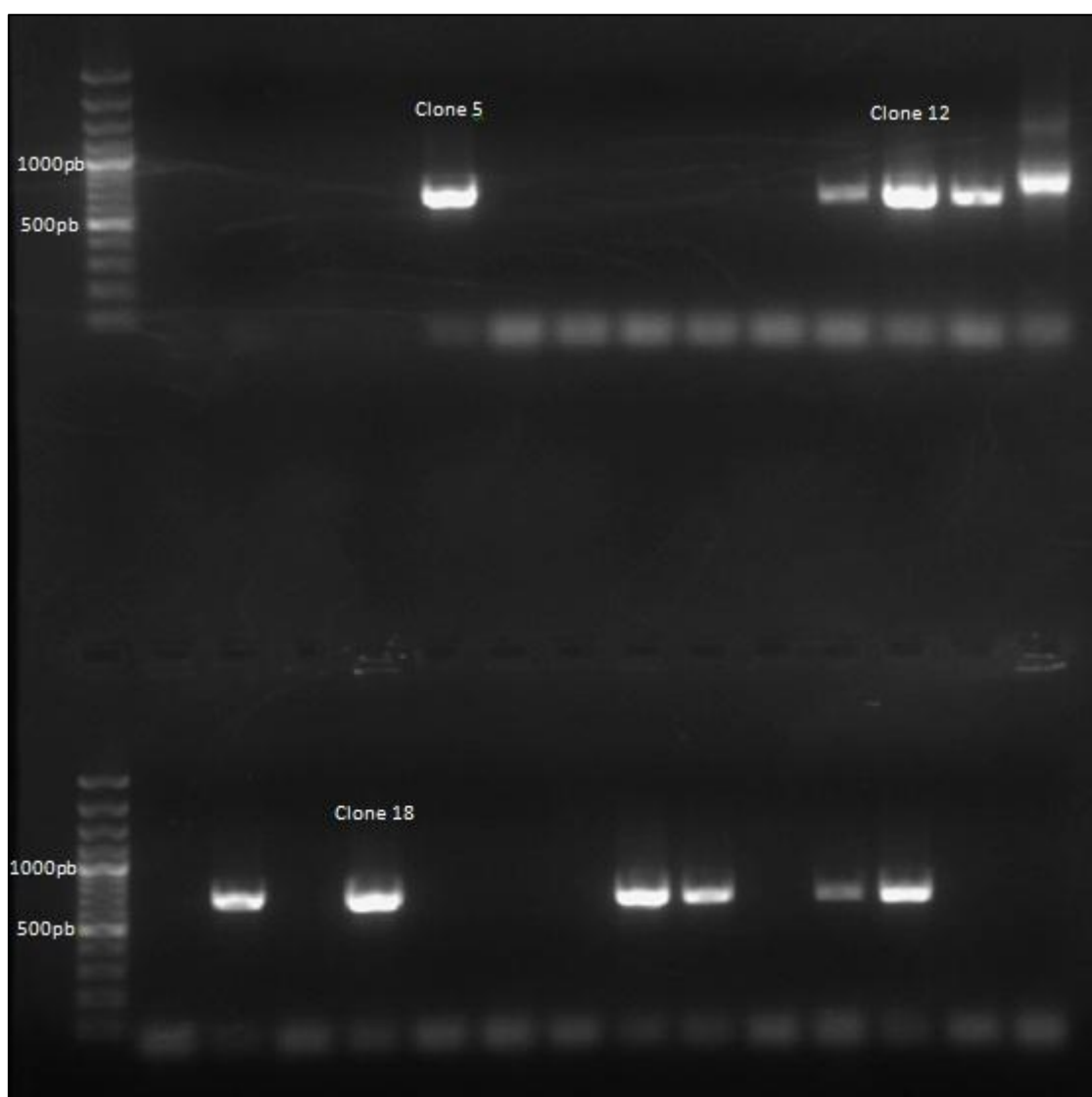


FIGURA 13 – RESULTADO DA PCR DE COLÔNIAS (LALP3/PGEM-T) ANALISADO EM GEL DE AGAROSE 1,5%. Das 28 colônias avaliadas, 11 foram positivas representadas na altura de aproximadamente 700pb. Foram selecionados os clones 5, 12 e 18 para o sequenciamento.

Além da confirmação dos 11 clones positivos por PCR de colônias, fez-se necessária uma análise mais aprofundada da construção LALP3 madura/pGEM-T. Desta forma, foi realizada uma reação de sequenciamento utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) e três dos clones observados anteriormente. Foram selecionados os clones 5, 12 e 18, os quais apresentam bandas específicas e de maior intensidade no gel. Após a reação de sequenciamento os produtos obtidos foram purificados e submetidos a sequenciamento pelo método de Sanger. A análise bioinformática dos eletroferogramas obtidos foi realizada utilizando o software ChromasPro e

então as sequências dos três clones foram submetidas a um alinhamento com a sequência do precursor da LALP3 depositada no GenBank (número GQ227491.1) utilizando a ferramenta online ClustalW. Desta forma, foi possível confirmar que as construções dos três clones possuíam a sequência da LALP3 madura.

5.2 Subclonagem da sequência da LALP3 madura em vetor de expressão pET20b+

Tendo em foco a subclonagem em vetor de expressão pET20b+, foi realizada a digestão do vetor (pET20b+) e do inserto (proveniente da construção LALP3madura/pGEM-T) com as enzimas NdeI e XhoI e o produto foi analisado em gel de agarose 1,5% sob uma fonte de luz negra. Foram visualizadas duas bandas, uma referente ao vetor digerido com aproximadamente 3,7Kb e outra referente ao inserto da LALP3 madura também digerido, com aproximadamente 600pb. Para a reação de ligação foi utilizada a proporção de moléculas de inserto:vetor de 3:1. Em seguida o produto de ligação foi transformado em *E. coli* DH5α eletrocompetente por eletroporação. Após o crescimento bacteriano foi possível observar 16 colônias na placa e então foi realizada uma PCR de colônias utilizando os oligonucleotídeos do vetor sense e antisense (T7 e T7T), onde após a eletroforese e posterior análise em gel de agarose 1,5% foi possível observar 13 bandas na altura de aproximadamente 650pb, indicando que 13 colônias possuíam a construção LALP3 madura em pET20b+ (Figura 14).

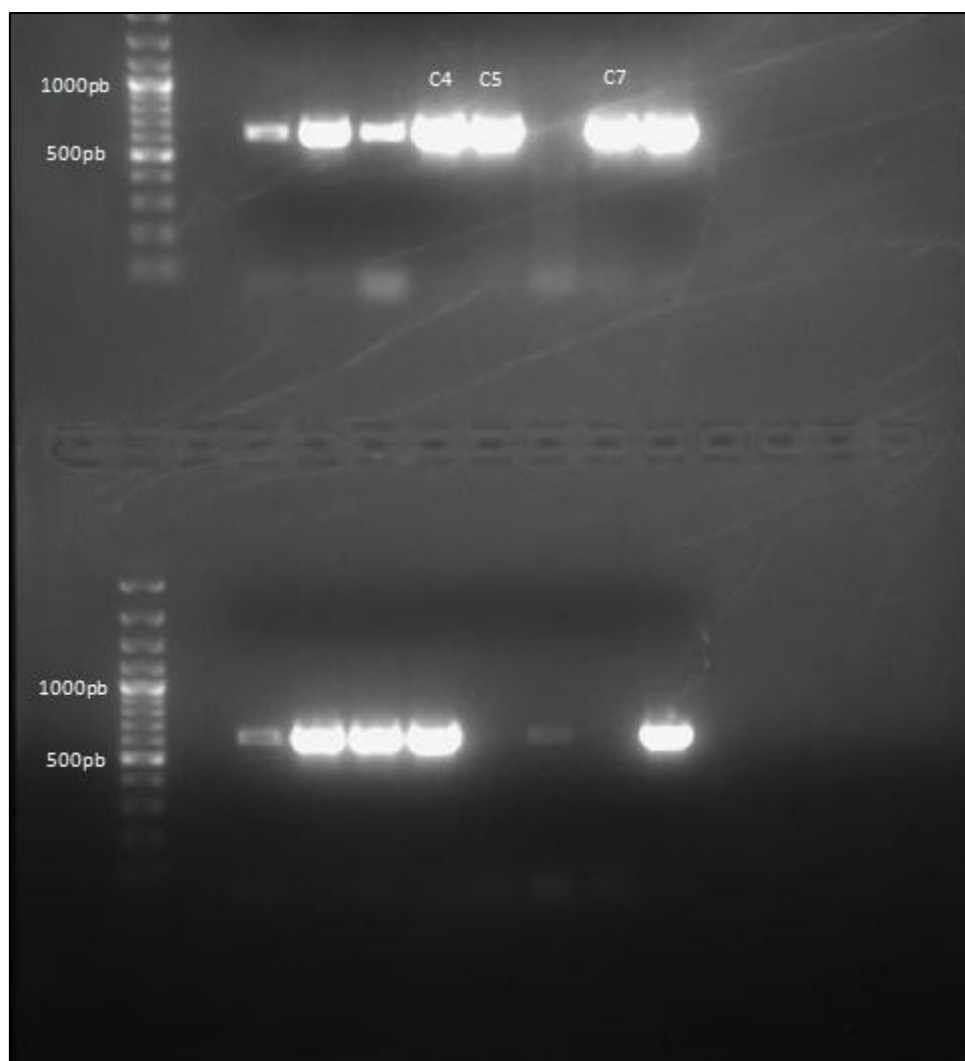


FIGURA 14 – RESULTADO DA PCR DE COLÔNIAS (LALP3/PET20B+) ANALISADO EM GEL DE AGAROSE 1,5%. Das 28 colônias avaliadas, 11 foram positivas representadas na altura de aproximadamente 650pb. Foram selecionados os clones 4, 5 e 7 para o sequenciamento e expressão da proteína.

Apenas três clones foram selecionados para a purificação plasmidial e posterior expressão da proteína recombinante, os quais foram determinados de acordo com a intensidade das bandas visualizadas no gel e especificidade das bandas, sendo desta forma os clones 4, 5 e 7 os escolhidos.

Visando a confirmação da sequência da construção, procedeu-se com uma minipreparação de DNA e posterior sequenciamento dos clones selecionados utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies), sendo que a análise dos eletroferogramas obtidos demonstraram que a sequência nucleotídica referente a LALP3 madura se encontrava íntegra nos três clones sequenciados.

Após o sequenciamento realizou-se a análise bioinformática da sequência nucleotídica buscando a confirmação da fase de leitura correta da construção utilizando a ferramenta online Translate Tool disponível online em <http://web.expasy.org/translate/>, onde foi observado que a fase de leitura 1 representava a sequência aminoacídica correta da LALP3 madura (Figura 15).



FIGURA 15 – ANÁLISE DAS TRÊS POSSÍVEIS FASES DE LEITURA DA CONTRUÇÃO LALP3 MADURA EM PET20B+. Observa-se que o “frame 1” representa a sequência aminoacídica esperada da proteína com a respectiva cauda de 6 histidinas. A primeira metionina da sequência (frame 1) representa a o primeiro aminoácido após o início da tradução após a adição de IPTG e o traço representa o término da tradução.

5.3 Padronização das condições de expressão ideais da LALP3/pET20b+

Após a obtenção da construção LALP3/pET20b+, foram realizados testes de mini-expressão para determinar a melhor condição a ser utilizada para a expressão da proteína recombinante. Durante o período de 4 horas após a indução da expressão da proteína com IPTG foi possível observar a presença de uma banda na altura de aproximadamente 24kDa a qual representa a LALP3 madura fusionada à cauda de 6 histidinas. Ao analisar a

curva de IPTG realizada foi possível determinar a concentração ideal do indutor a ser utilizada no caso de uma expressão em maior escala visando a produção e posterior purificação da proteína recombinante. Foi observado que nos testes de mini-expressão realizados por 4 horas a 30°C utilizando a cepa SHuffle T7 Express LysY (New England Biolabs) houve a expressão da proteína nas três concentrações de IPTG utilizadas (0,05mM, 0,1mM e 0,5mM), sendo que a expressão foi gradual ao longo do tempo. Contudo, ao analisar o perfil eletroforético da amostra referente ao sobrenadante obtido após a lise da cultura bacteriana, não foi possível observar uma banda de intensidade semelhante à banda observada após 4 horas de expressão, indicando que a proteína recombinante não se apresentava solúvel ou apenas uma pequena fração da mesma se apresentava na condição solúvel frente às condições avaliadas (Figura 16 A, B e C).

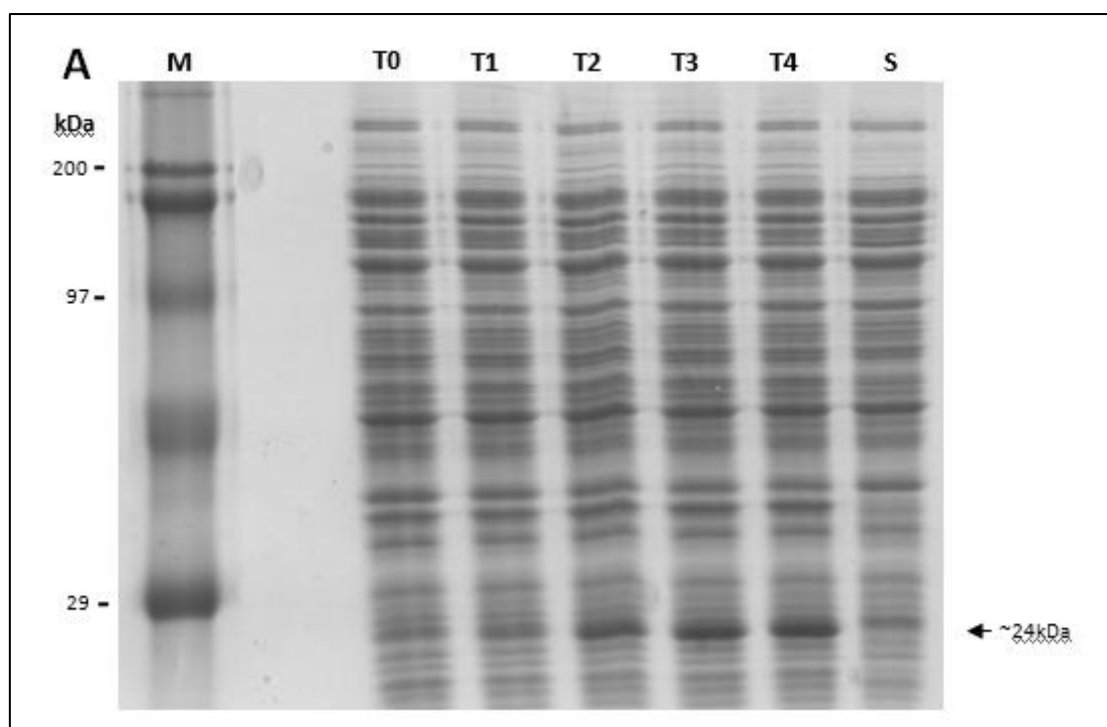


FIGURA 16 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/PET20B+ EM MEIO LB LÍQUIDO A 30°C UTILIZANDO A CEPA SHUFFLE T7 EXPRESS LYSY. Expressão realizada utilizando 0,05mM (A), 0,1mM (B) e 0,5mM (C) de IPTG a 30°C. A seta representa as bandas na altura de aproximadamente 24kDa referentes a proteína recombinante. A marcação “T0” representa o início da indução e “T1”, “T2”, “T3” e “T4” indicam o tempo de expressão em horas. É possível observar o aumento da expressão da proteína ao longo do tempo. A amostra relativa ao sobrenadante está representada em “S”, sendo que ao comparar a banda obtida com a banda de “T0” observa-se que não há diferença de intensidade significativa, indicando que a proteína não está solúvel ou apenas uma fração da proteína está solúvel.

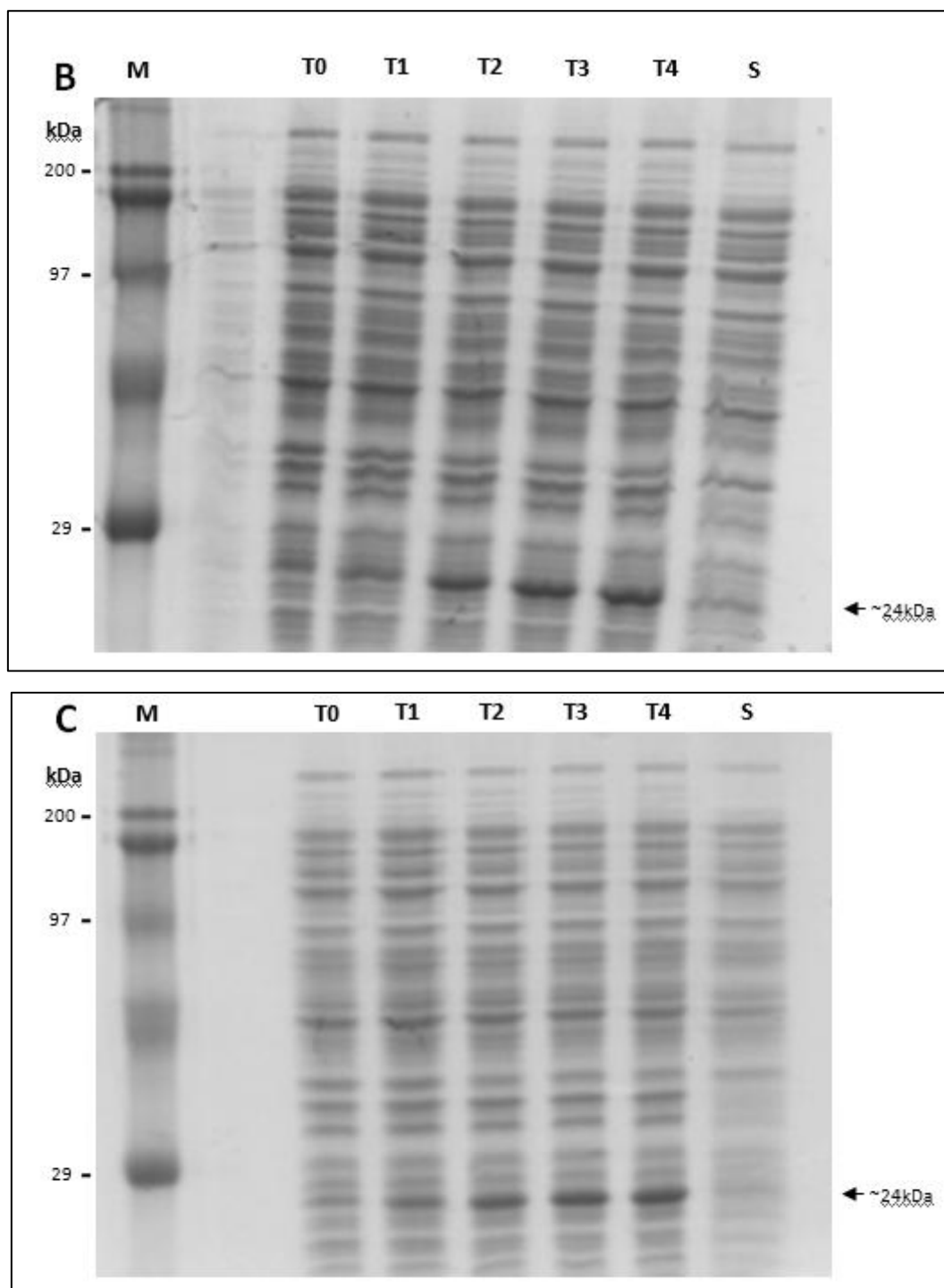


FIGURA 16 (CONTINUAÇÃO) – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/PET20B+ EM MEIO LB LÍQUIDO A 30°C UTILIZANDO A CEPA SHUFFLE T7 EXPRESS LYSY. Expressão realizada utilizando 0,05mM (A), 0,1mM (B) e 0,5mM (C) de IPTG a 30°C. A seta representa as bandas na altura de aproximadamente 24kDa referentes a proteína recombinante. A marcação “T0” representa o início da indução e “T1”, “T2”, “T3” e “T4” indicam o tempo de expressão em horas. É possível observar o aumento da expressão da proteína ao longo do tempo. A amostra relativa ao sobrenadante está representada em “S”, sendo que ao comparar a banda obtida com a banda de “T0” observa-se que não há diferença de intensidade significativa, indicando que a proteína não está solúvel ou apenas uma fração da proteína está solúvel.

Foi realizado outro teste de mini-expressão utilizando as mesmas condições de temperatura e cepa de *E. coli*, contudo o meio utilizado foi o Triptona-Fosfato, o qual contém glicose e sais de fosfato, constituindo assim um meio mais rico em nutrientes e com características tamponantes em comparação com o meio LB líquido. As concentrações de IPTG avaliadas foram 0,05mM, 0,1mM e 0,5mM. As culturas induzidas com 0,05mM e 0,1mM de IPTG não apresentaram aumento da expressão da proteína ao longo de 4 horas, uma vez que as bandas correspondentes à proteína recombinante permaneceram semelhantes nos tempos 0 horas e 4 horas (Figura 17 A e B). A cultura induzida com 0,5mM de IPTG apresentou bandas correspondentes à proteína recombinante com intensidade maior ao longo do tempo de expressão (Figura 17 C), indicando que abaixo de 0,5mM de indutor não é possível observar a expressão da proteína nas condições avaliadas. Ainda, ao analisar as bandas referentes do sobrenadante obtido após a lise da cultura bacteriana, observa-se que a proteína não se encontra solúvel ou apenas uma fração da mesma se encontra condição solúvel em todas das condições avaliadas.

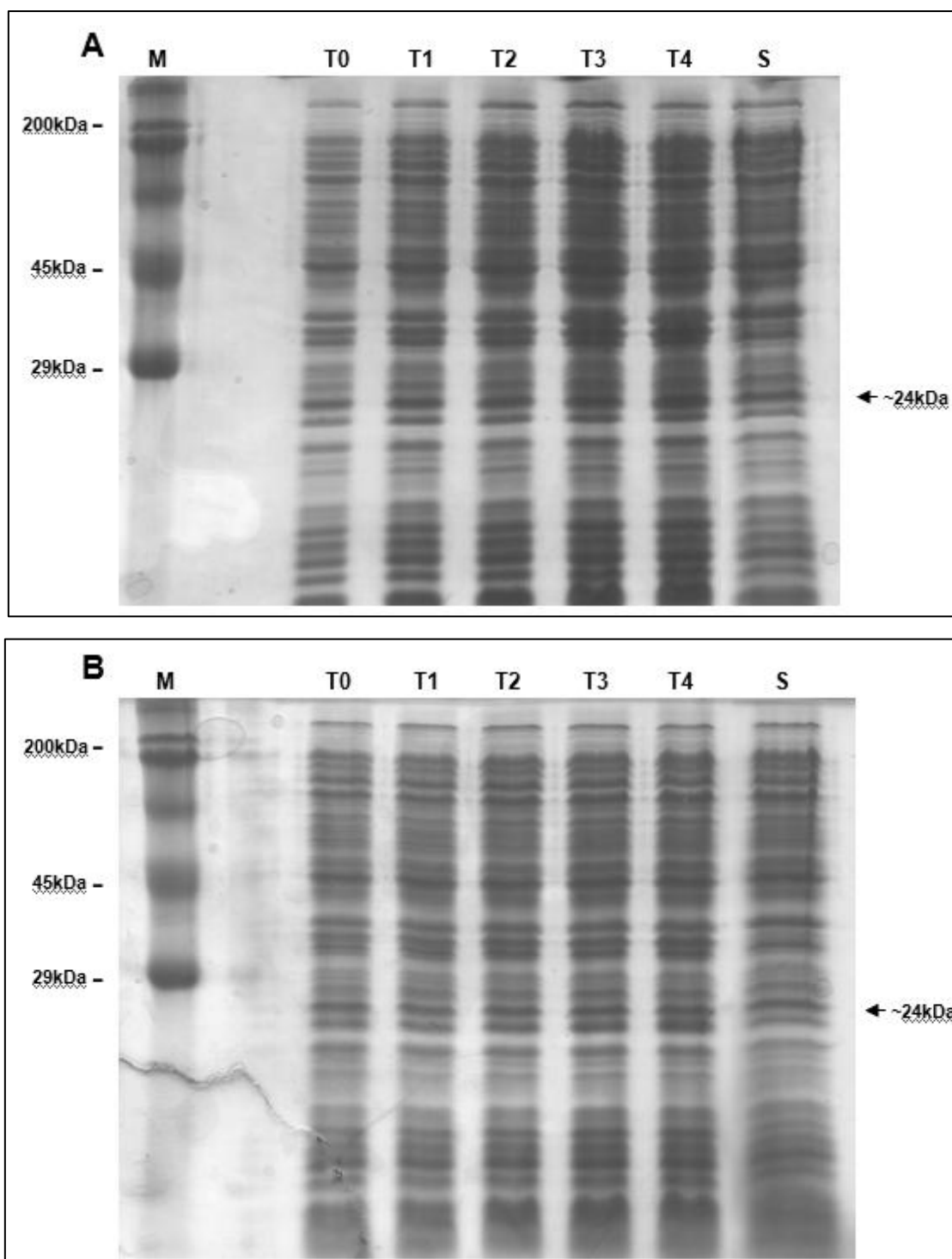


FIGURA 17 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/PET20B+ EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 30°C UTILIZANDO A CEPA SHUFFLE T7 EXPRESS LYSY. Expressão realizada utilizando 0,05mM (A), 0,1mM (B) e 0,5mM (C) de IPTG a 30°C. A seta representa as bandas na altura de aproximadamente 24kDa referentes a proteína recombinante. A marcação “T0” representa o início da indução e “T1”, “T2”, “T3” e “T4” indicam o tempo de expressão em horas. É possível observar o aumento da expressão da proteína ao longo do tempo apenas na figura C, onde em “T4” observa-se a banda de maior intensidade relativa a expressão. A amostra relativa ao sobrenadante está representada em “S”, sendo que ao comparar a banda obtida com a banda de “T0” observa-se que não há diferença de intensidade significativa nas três condições avaliadas, indicando que a proteína não está solúvel ou apenas uma fração da proteína está solúvel.

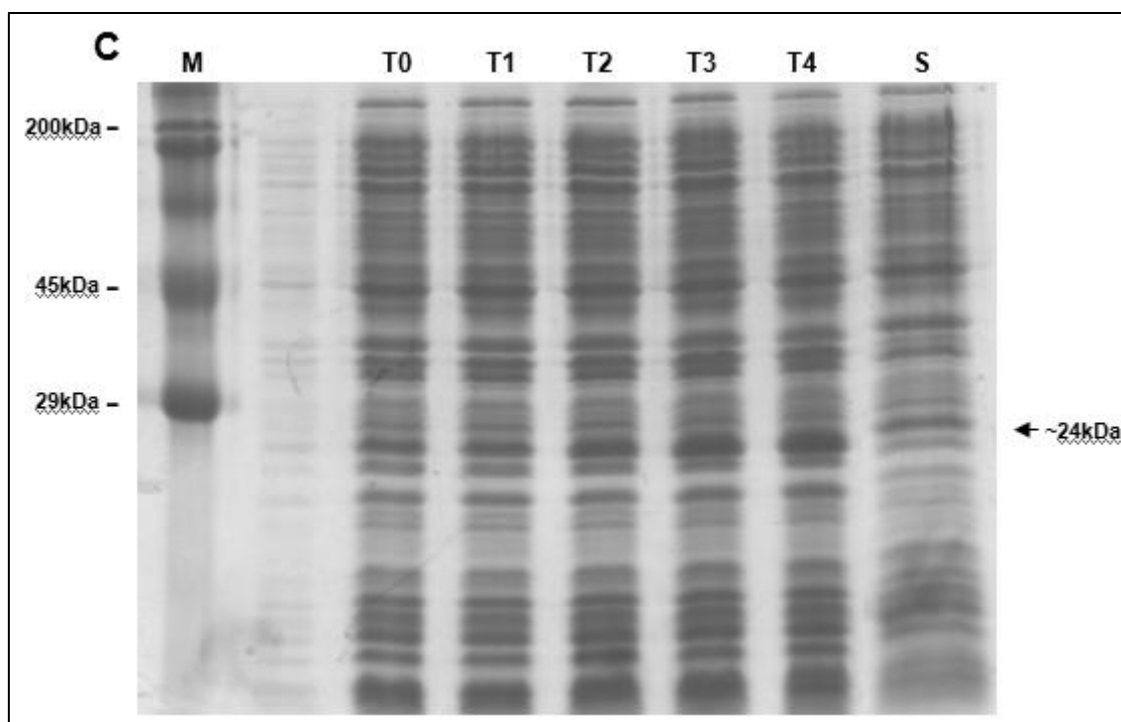


FIGURA 17 (CONTINUAÇÃO) – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/PET20B+ EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 30°C UTILIZANDO A CEPA SHUFFLE T7 EXPRESS LYSY. Expressão realizada utilizando 0,05mM (A), 0,1mM (B) e 0,5mM (C) de IPTG a 30°C. A seta representa as bandas na altura de aproximadamente 24kDa referentes a proteína recombinante. A marcação “T0” representa o início da indução e “T1”, “T2”, “T3” e “T4” indicam o tempo de expressão em horas. É possível observar o aumento da expressão da proteína ao longo do tempo apenas na figura C, onde em “T4” observa-se a banda de maior intensidade relativa a expressão. A amostra relativa ao sobrenadante está representada em “S”, sendo que ao comparar a banda obtida com a banda de “T0” observa-se que não há diferença de intensidade significativa nas três condições avaliadas, indicando que a proteína não está solúvel ou apenas uma fração da proteína está solúvel.

Uma vez que a proteína recombinante não se apresentou na condição solúvel nos testes realizados nas condições mencionadas anteriormente, foram realizados duas mini-expressões utilizando a mesma cepa de *E. coli* e meio Triptona-Fosfato com concentração de indutor, tempo de expressão e temperatura diferentes. A concentração de IPTG avaliada foi 0,5mM e a expressão foi realizada em tempos de 16 horas e 24 horas a 20°C. Foi observado que em ambas as condições avaliadas houve o aumento da expressão da proteína ao longo de 16 e 24 horas (Figura 18 A e B). Contudo, ao analisar as bandas referentes às amostras do sobrenadante obtido após a lise das culturas bacterianas, observa-se que a intensidade destas bandas é semelhante à intensidade da banda referente ao tempo inicial de expressão

(T0), de modo que proteína não se encontra solúvel ou apenas uma fração da mesma se encontra condição solúvel em todas das condições avaliadas.

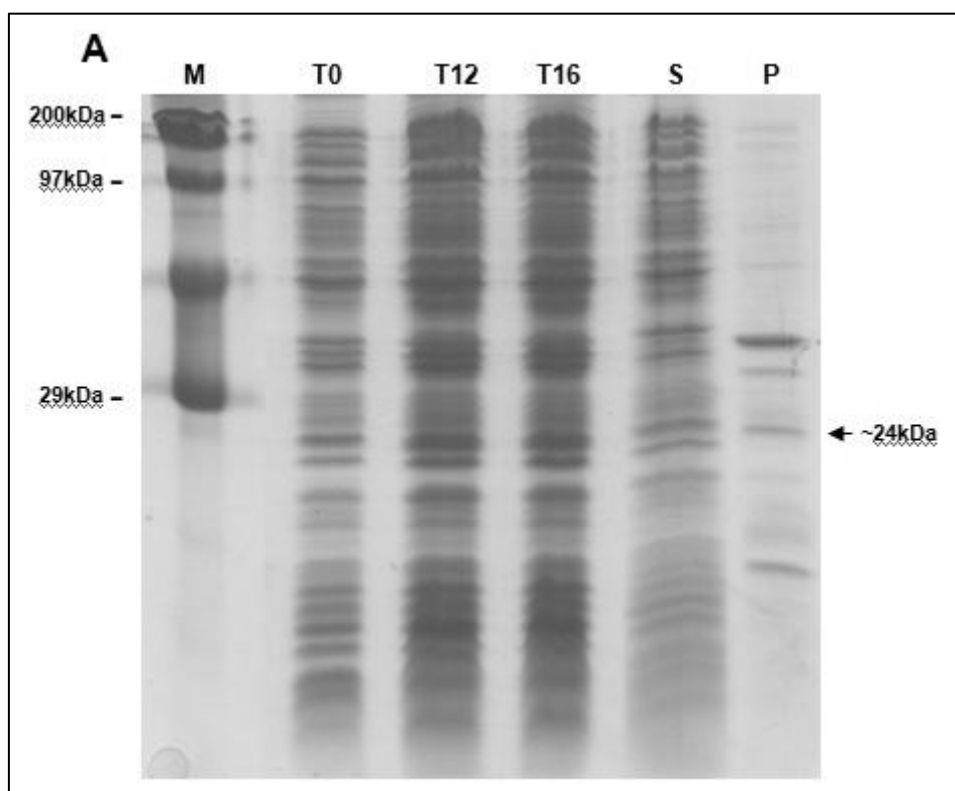


FIGURA 18 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/PET20B+ EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 20°C UTILIZANDO A CEPA SHUFFLE T7 EXPRESS LYSY. Expressão realizada utilizando 0,5mM de IPTG a 20°C por 16h (A) e 24h (B). A seta representa as bandas na altura de aproximadamente 24kDa referentes a proteína recombinante. A marcação “T0” representa o início da indução e “T12”, “T16”, “T24” e indicam o tempo de expressão em horas. É possível observar o aumento da expressão da proteína ao longo do tempo nas figuras A e B, onde em “T16” (A) e “T24” (B) observa-se a banda de maior intensidade relativa a expressão. A amostra relativa ao sobrenadante está representada em “S”, sendo que ao comparar a banda obtida com a banda de “T0” observa-se que não há diferença de intensidade significativa em ambas as condições avaliadas, indicando que a proteína não está solúvel ou apenas uma fração da proteína está solúvel. Ainda, em “P” está representada a fração relativa ao precipitado bacteriano obtido após a lise da cultura, onde observa-se que a proteína recombinante foi expressa na condição insolúvel.

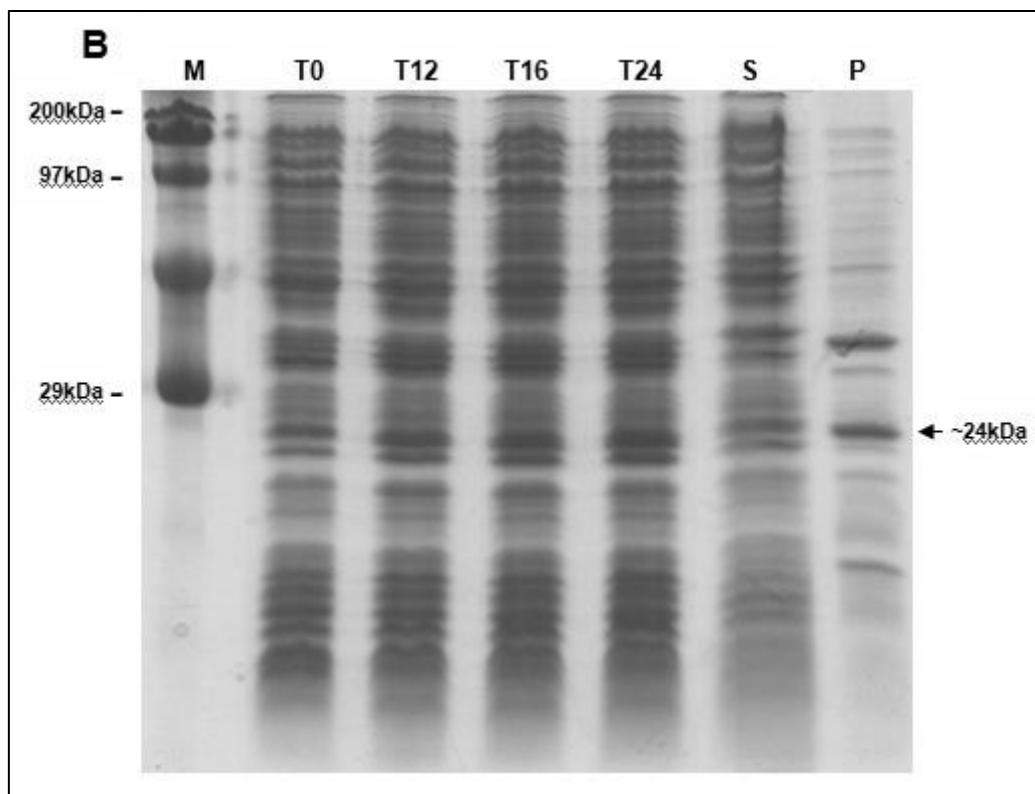


FIGURA 18 (CONTINUAÇÃO) – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/PET20B+ EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 20°C UTILIZANDO A CEPA SHUFFLE T7 EXPRESS LYSY. Expressão realizada utilizando 0,5mM de IPTG a 20°C por 16h (A) e 24h (B). A seta representa as bandas na altura de aproximadamente 24kDa referentes a proteína recombinante. A marcação “T0” representa o início da indução e “T12”, “T16”, “T24” e indicam o tempo de expressão em horas. É possível observar o aumento da expressão da proteína ao longo do tempo nas figuras A e B, onde em “T16” (A) e “T24” (B) observa-se a banda de maior intensidade relativa a expressão. A amostra relativa ao sobrenadante está representada em “S”, sendo que ao comparar a banda obtida com a banda de “T0” observa-se que não há diferença de intensidade significativa em ambas as condições avaliadas, indicando que a proteína não está solúvel ou apenas uma fração da proteína está solúvel. Ainda, em “P” está representada a fração relativa ao precipitado bacteriano obtido após a lise da cultura, onde observa-se que a proteína recombinante foi expressa na condição insolúvel.

Uma vez que as expressões da LALP3 madura utilizando o vetor pET20b+ não resultaram na proteína em condição solúvel, foi adotada uma nova estratégia pela qual se fez o uso do sistema de expressão Champion pET-SUMO Expression System (Invitrogen). Expressões utilizando o vetor Champion pET-SUMO resultam na adição de uma etiqueta de 6 histidinas, fundamental para a purificação por cromatografia de afinidade em resina Ni-NTA Agarose; seguida da proteína “SUMO”, que promove maior solubilidade e auxilia no dobramento da proteína recombinante de interesse; à posição N-terminal da LALP3 madura.

5.4 Subclonagem da sequência da LALP3 madura em vetor de expressão Champion pET-SUMO

A partir da construção LALP3/pGEM-T previamente obtida foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando a enzima Pfu DNA Polimerase e os oligonucleotídeos gene-específicos *sense* (5'-AACGCTCTCAAGTATGACAG-3') e *antisense* (3'-CCTTTCCTGTTTAAGATTGGC-5') para a obtenção do cDNA referente à LALP3 madura. Após a visualização da banda referente ao produto da reação de PCR (~600pb), a mesma foi excisada do gel e purificada. Após a gel purificação a leitura espectrofotométrica da amostra obtida foi $A_{260/280} \geq 1,8$.

Após a obtenção do inserto, foi realizada a clonagem do cDNA referente à LALP3 madura no vetor Champion pET-SUMO. Para tanto, as extremidades 3'-OH do inserto foram adeniladas após a gel purificação em uma reação utilizando a Taq DNA polimerase e nucleotídeos de adenina. O produto desta reação foi analisado em gel de agarose 1,5% e após a confirmação da banda referente ao inserto (~600pb), a mesma foi extraída do gel e uma nova gel purificação e leitura espectrofotométrica utilizando as mesmas condições mencionadas anteriormente foi realizada.

O inserto contendo as extremidades 3'-OH adeniladas foi ligado ao vetor de expressão Champion pET-SUMO em uma reação utilizando a enzima T4 DNA ligase. O produto da ligação foi precipitado e a construção obtida foi transformada em *E. coli* One Shot Mach1-T1^R competente por choque térmico.

Para confirmar a presença da construção correta nos clones obtidos foi realizada uma PCR de colônias de 14 clones selecionados aleatoriamente da placa, utilizando os oligonucleotídeos gene-específicos *sense* para o vetor (5'-AGATTCTTGTACGACGGTATTAG-3') e *antisense* para sequência do cDNA da LALP3 madura (3'-CCTTTCCTGTTTAAGATTGGC-5'). Após a reação de PCR, os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose 1,5%, onde foram constatados 12 clones positivos representados na altura de aproximadamente 800pb referentes à LALP3 fusionada à proteína SUMO (Figura 19).

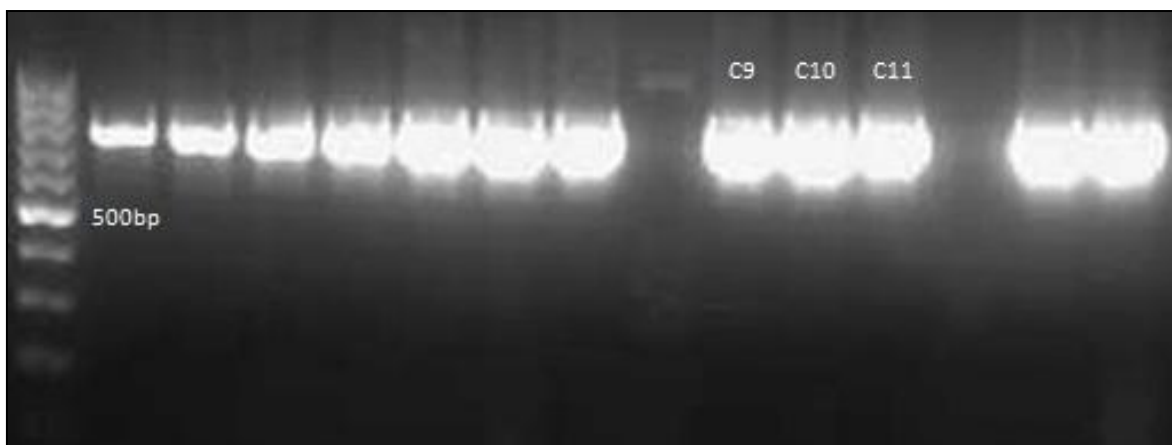


FIGURA 19 – RESULTADO DA REAÇÃO DE PCR DE COLÔNIAS (LALP3/PET-SUMO) ANALISADO EM GEL DE AGAROSE 1,5%. Das 14 colônias avaliadas, 12 se apresentaram como positivas, representadas na altura de aproximadamente 800pb. Foram selecionados os clones 9, 10 e 11 para a reação de sequenciamento.

Em uma análise mais aprofundada para confirmar a fase de leitura e sequência corretas da construção LALP3 madura/pET-SUMO foi realizada uma minipreparação plasmidial dos clones 9, 10 e 11 por apresentarem bandas específicas e de maior intensidade no gel de agarose, e em seguida uma reação de sequenciamento utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies).

Após a reação de sequenciamento os produtos obtidos foram purificados e submetidos a sequenciamento. A análise bioinformática das sequências obtidas nos eletroferogramas foi realizada utilizando o software ChromasPro. As sequências dos três clones foram submetidas a um alinhamento com a sequência do precursor da LALP3 depositada no GenBank (número GQ227491.1) utilizando a ferramenta online ClustalW (disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Desta forma, foi possível confirmar que as construções dos três clones possuíam a sequência da LALP3 madura sem mutações e na fase de leitura correta do vetor (dados não mostrados).

5.5 Padronização das condições de expressão ideais da LALP3/SUMO em *E. coli* SHuffle T7 Express LysY

Após a obtenção da construção LALP3/SUMO, foram realizados testes de mini-expressão para determinar a melhor condição a ser utilizada para a

expressão da proteína recombinante. Primeiramente foram realizadas mini-expressões por 4 horas a 30°C utilizando a cepa SHuffle T7 Express LysY (New England Biolabs). Durante o período de 4 horas após a indução da expressão da proteína com IPTG foi possível observar a presença de uma banda na altura de aproximadamente 36kDa a qual representa a LALP3 madura (~24kDa) fusionada à proteína SUMO (~14kDa). Ao analisar a curva de IPTG realizada foi possível determinar a concentração ideal do indutor a ser utilizada no caso de uma expressão em maior escala visando a produção e posterior purificação da proteína recombinante. Contudo, foi observado que as mini-expressões induzidas com 0,5mM, 1mM e 2mM de IPTG apresentaram melhor rendimento após 4 horas de expressão, ao passo que os testes realizados utilizando as concentrações menores do indutor não apresentaram um alto rendimento na expressão. Contudo, ao analisar o perfil eletroforético da amostra referente ao sobrenadante obtido após a lise da cultura bacteriana, não foi possível observar uma banda de intensidade semelhante à banda observada após 4 horas de expressão, indicando que a proteína recombinante não se apresentava solúvel frente às condições avaliadas. Na expressão com 2mM de IPTG foi possível observar uma banda na altura de aproximadamente 36kDa na amostra referente ao sobrenadante com maior intensidade se comparada às mesmas bandas das expressões utilizando menos IPTG, indicando que apenas uma fração da LALP3 madura fusionada à proteína SUMO estava solúvel (Figura 20 A, B, C, D e E). Em contrapartida, ao analisar o perfil eletroforético das amostras referentes ao precipitado das culturas bacterianas após a lise, em todos os testes de mini-expressão realizados, foi possível observar uma banda de alta intensidade na altura de aproximadamente 36kDa, sugerindo que a proteína recombinante foi expressa em grande quantidade, porém, em corpos de inclusão na condição insolúvel.

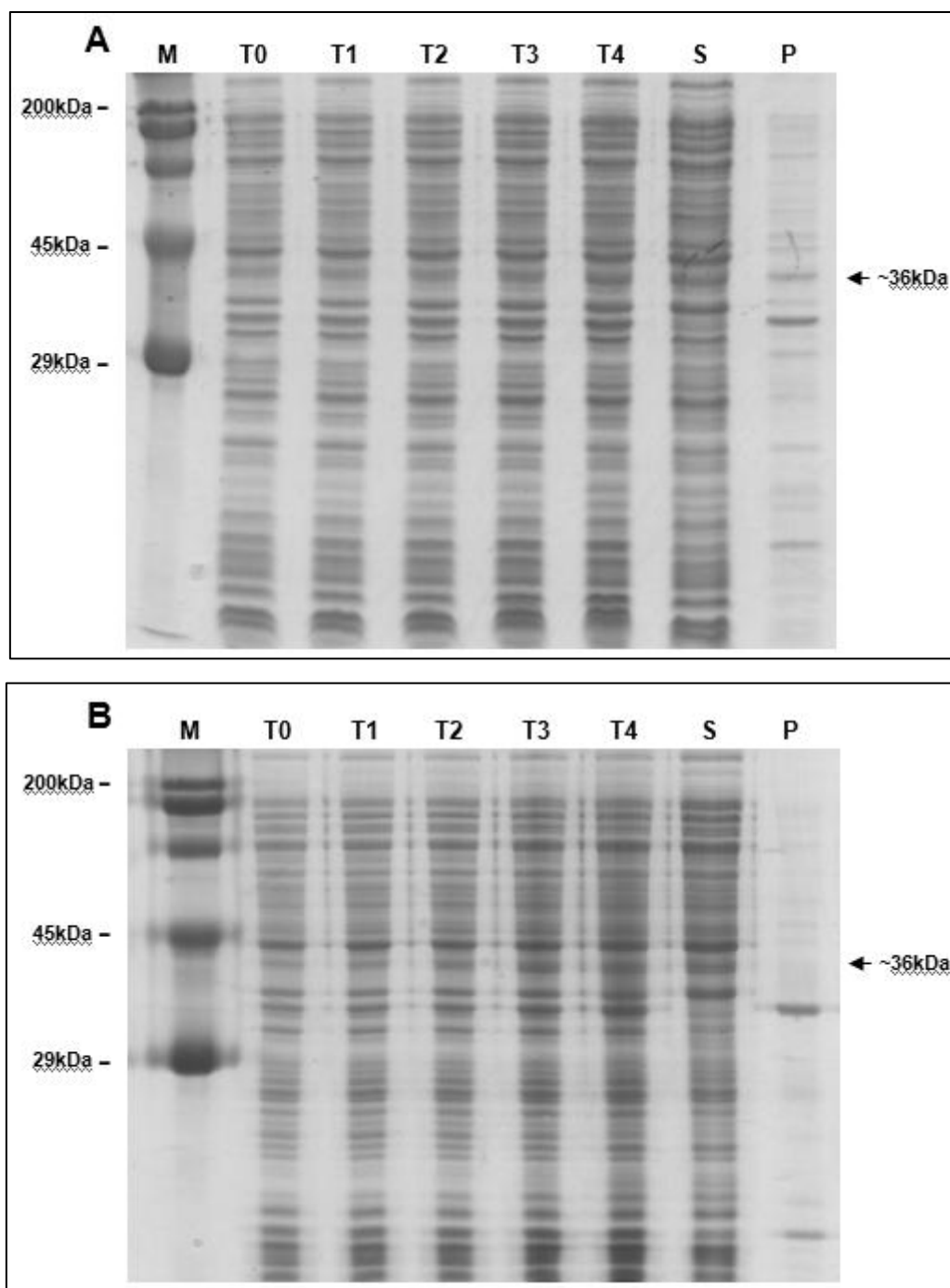


FIGURA 20 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/SUMO EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 30°C UTILIZANDO A CEPA SHUFFLE T7 EXPRESS LYSY. Expressões realizadas utilizando 0,05mM (A), 0,1mM (B), 0,5mM (C), 1mM (D) e 2mM (E) de IPTG a 30°C. As setas representam as bandas na altura de aproximadamente 36kDa referentes a LALP3 madura fusionada à proteína SUMO. A marcação “T0” representa o início da indução e “T1”, “T2”, “T3” e “T4” indicam o tempo de expressão em horas. É possível observar o aumento da expressão da proteína ao longo do tempo. A amostra relativa ao sobrenadante está representada em “S”, sendo que ao comparar a banda obtida com a banda de “T0” observa-se que há uma pequena diferença de intensidade, indicando que a proteína está parcialmente solúvel. Em “P” está representada a amostra referente ao precipitado obtido após a lise das culturas bacterianas.

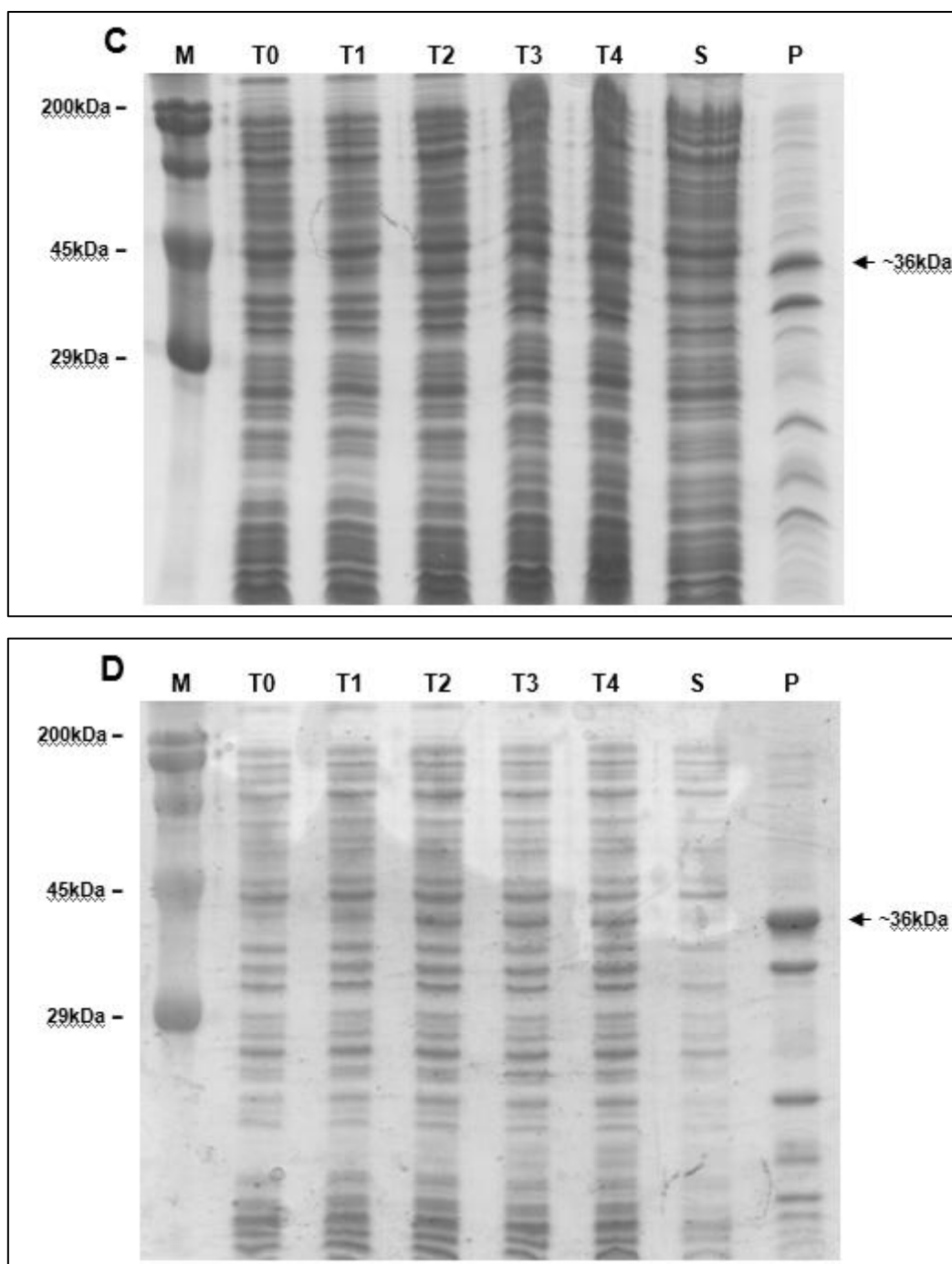


FIGURA 20 (CONTINUAÇÃO) – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/SUMO EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 30°C UTILIZANDO A CEPA SHUFFLE T7 EXPRESS LYSY. Expressões realizadas utilizando 0,05mM (A), 0,1mM (B), 0,5mM (C), 1mM (D) e 2mM (E) de IPTG a 30°C. As setas representam as bandas na altura de aproximadamente 36kDa referentes a LALP3 madura fusionada à proteína SUMO. A marcação “T0” representa o início da indução e “T1”, “T2”, “T3” e “T4” indicam o tempo de expressão em horas. É possível observar o aumento da expressão da proteína ao longo do tempo. A amostra relativa ao sobrenadante está representada em “S”, sendo que ao comparar a banda obtida com a banda de “T0” observa-se que há uma pequena diferença de intensidade, indicando que a proteína está parcialmente solúvel. Em “P” está representada a amostra referente ao precipitado obtido após a lise das culturas bacterianas.

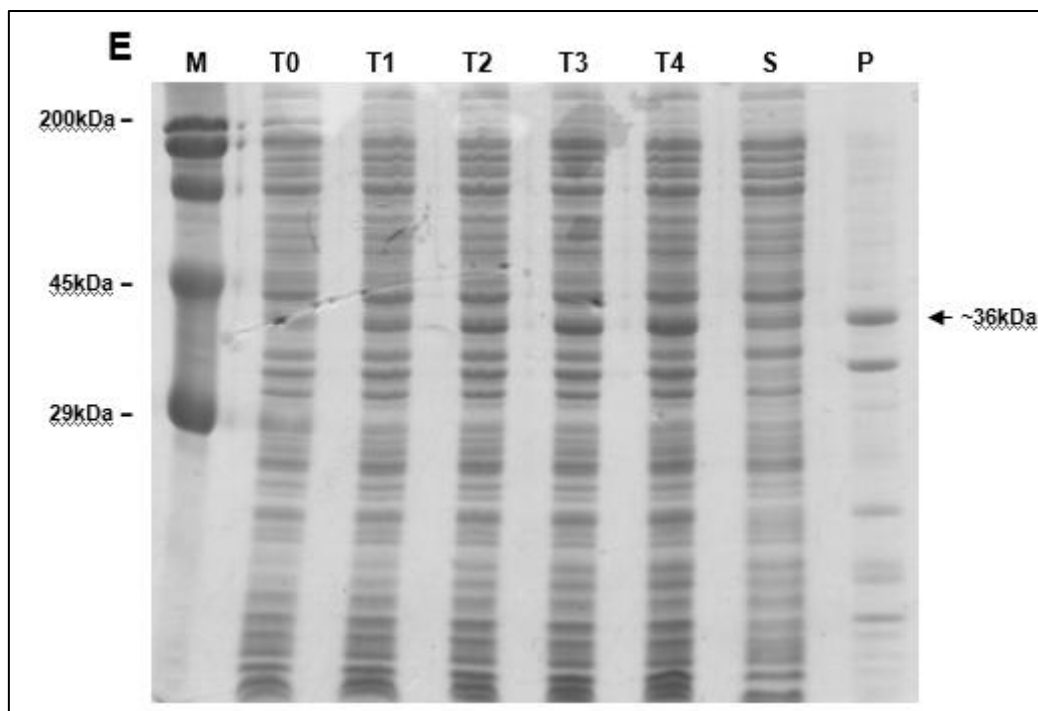


FIGURA 20 (CONTINUAÇÃO) – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/SUMO EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 30°C UTILIZANDO A CEPA SHUFFLE T7 EXPRESS LYSY. Expressões realizadas utilizando 0,05mM (A), 0,1mM (B), 0,5mM (C), 1mM (D) e 2mM (E) de IPTG a 30°C. As setas representam as bandas na altura de aproximadamente 36kDa referentes a LALP3 madura fusionada à proteína SUMO. A marcação “T0” representa o início da indução e “T1”, “T2”, “T3” e “T4” indicam o tempo de expressão em horas. É possível observar o aumento da expressão da proteína ao longo do tempo. A amostra relativa ao sobrenadante está representada em “S”, sendo que ao comparar a banda obtida com a banda de “T0” observa-se que há uma pequena diferença de intensidade, indicando que a proteína está parcialmente solúvel. Em “P” está representada a amostra referente ao precipitado obtido após a lise das culturas bacterianas.

A fim de confirmar se a LALP3 madura fusionada à proteína SUMO estava solúvel, foram realizados imunoensaios de *Western Blotting* com as amostras referentes aos sobrenadantes obtidos após a lise da cultura bacteriana das expressões com 0,05mM, 0,1mM, 0,5mM, 1mM e 2mM de IPTG. Foram utilizados anticorpos primários específicos para a cauda de 6 histidinas presente na região N-terminal da proteína recombinante e anticorpos secundários específicos para os anticorpos primários conjugados à enzima fosfatase alcalina. Como resultado foi possível observar que a proteína recombinante, representada pela banda de aproximadamente 36kDa, se apresentava solúvel em todas as concentrações de IPTG testadas, porém, com rendimento maior quando utilizado 2mM de IPTG para a expressão. Além da banda observada em 36kDa, foi possível observar bandas de massa molecular inferior à 29kDa em todas as amostras avaliadas. Uma vez que foram utilizados

anticorpos primários específicos para a cauda de 6 histidinas antecedente à proteína SUMO, sugere-se que tais bandas sejam representadas pela proteína SUMO não fusionada à LALP3. Ainda, bandas de menor intensidade foram observadas principalmente nas amostras de 0,1mM, 0,5mM, 1mM e 2mM logo abaixo da banda de 36kDa, sugerindo que houve truncamento durante a expressão da proteína, gerando fragmentos incompletos da mesma (Figura 21 A e B).

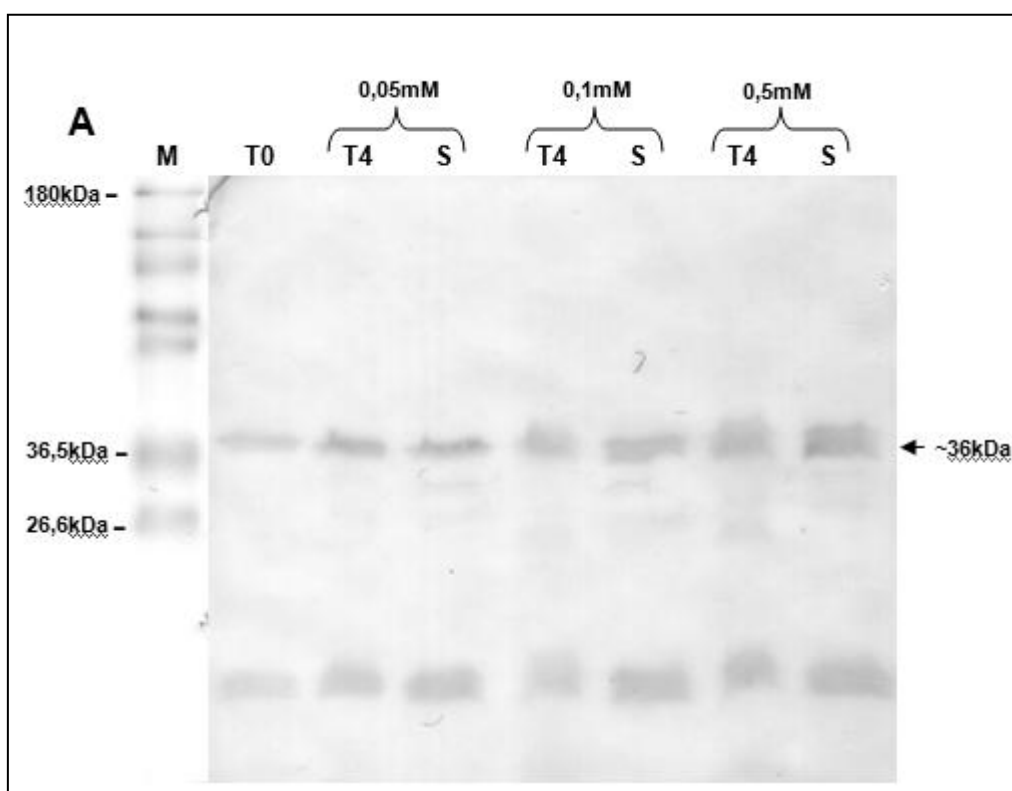


FIGURA 21 – ANÁLISE POR *WESTERN BLOTTING* DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/SUMO EXPRESSA EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 30°C UTILIZANDO A CEPA SHUFFLE T7 EXPRESS LYSY. Amostras referentes às expressões realizadas utilizando 0,05mM; 0,1mM; 0,5mM (A); 1mM e 2mM (B) de IPTG. As setas representam as bandas na altura de aproximadamente 36kDa referentes a LALP3 madura fusionada à proteína SUMO. Em “T0” está representado o início da indução e em “T4” e “S” estão indicados o tempo de expressão em horas e o sobrenadante obtido após a lise da cultura bacteriana respectivamente. Observa-se que em todos os casos as amostras correspondentes ao sobrenadante “S” apresentam bandas com maior intensidade se comparadas à amostra representada em “T0”, indicando que a proteína recombinante estava solúvel, de modo que 1mM e 2mM de IPTG apresentaram maior rendimento da LALP3 madura/SUMO na condição solúvel. Bandas inespecíficas foram visualizadas com massa menor que 36kDa, representando frações truncadas da proteína.

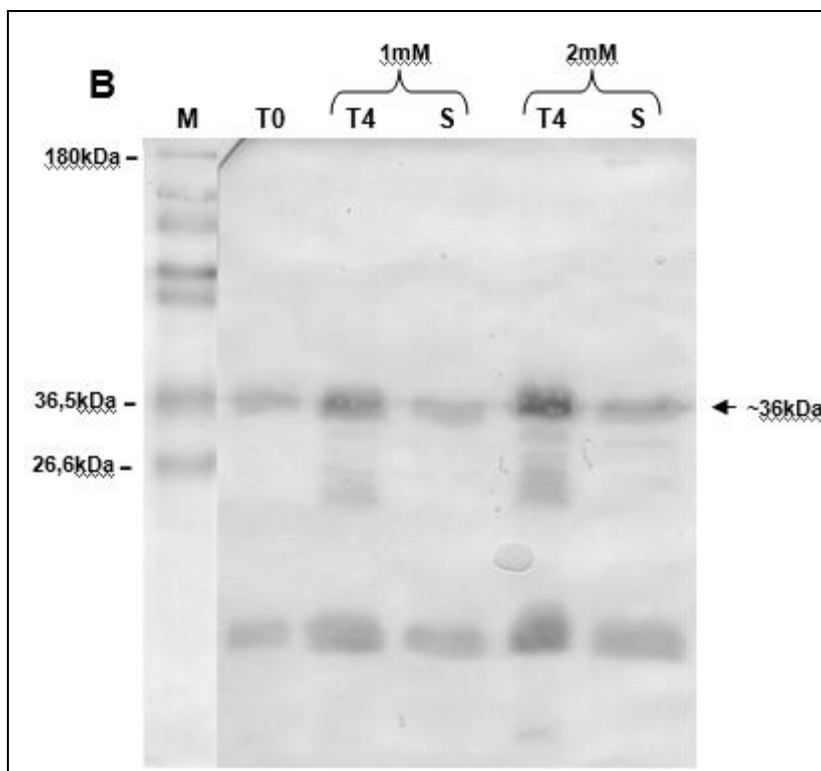


FIGURA 21 (CONTINUAÇÃO) – ANÁLISE POR *WESTERN BLOTTING* DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/SUMO EXPRESSA EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 30°C UTILIZANDO A CEPA SHUFFLE T7 EXPRESS LYSY. Amostras referentes às expressões realizadas utilizando 0,05mM; 0,1mM; 0,5mM (A); 1mM e 2mM (B) de IPTG. As setas representam as bandas na altura de aproximadamente 36kDa referentes a LALP3 madura fusionada à proteína SUMO. Em “T0” está representado o início da indução e em “T4” e “S” estão indicados o tempo de expressão em horas e o sobrenadante obtido após a lise da cultura bacteriana respectivamente. Observa-se que em todos os casos as amostras correspondentes ao sobrenadante “S” apresentam bandas com maior intensidade se comparadas à amostra representada em “T0”, indicando que a proteína recombinante estava solúvel, de modo que 1mM e 2mM de IPTG apresentaram maior rendimento da LALP3 madura/SUMO na condição solúvel. Bandas inespecíficas foram visualizadas com massa menor que 36kDa, representando frações truncadas da proteína.

Considerando os resultados obtidos com as expressões realizadas a 30°C utilizando diferentes concentrações de IPTG, onde foi verificado um possível truncamento da proteína durante a expressão, uma nova estratégia foi adotada. Visando a redução da expressão da LALP3 madura truncada, foram realizadas duas novas expressões utilizando a cepa SHuffle T7 Express LysY (New England Biolabs), onde a expressão da proteína se deu por 16 horas a 20°C, com 0,05mM e 0,1mM de IPTG. Durante e após a expressão da proteína recombinante, as amostras foram submetidas às mesmas condições de lise e preparo citadas anteriormente.

Foi realizado um SDS-PAGE sob condições redutoras a fim de avaliar a expressão da LALP3 madura. Verificou-se que mesmo com a redução da

temperatura e diminuição da concentração de IPTG foi possível observar a presença de uma banda de baixa intensidade, na altura de aproximadamente 36kDa correspondente à fração referente ao sobrenadante obtido após a lise da cultura bacteriana, indicando que pouca massa da proteína recombinante estava em condição solúvel (Figura 22).

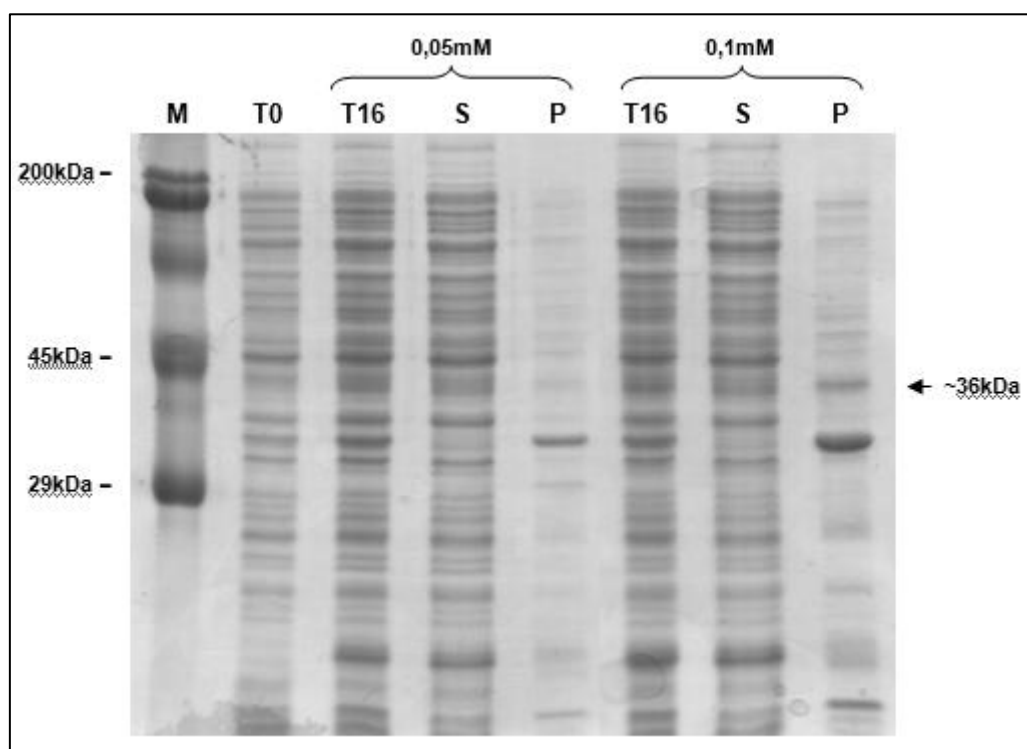


FIGURA 22 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/SUMO EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 20°C UTILIZANDO A CEPA SHUFFLE T7 EXPRESS LYSY. Expressões realizadas utilizando 0,05mM e 0,1mM de IPTG a 20°C. As setas representam as bandas na altura de aproximadamente 36kDa referentes a LALP3 madura fusionada à proteína SUMO. A marcação “T0” representa o início da indução e “T16” indica o tempo de expressão em horas. É possível observar o aumento da expressão da proteína após a expressão. A amostra relativa ao sobrenadante está representada em “S”, sendo que ao comparar a banda obtida com a banda de “T0” observa-se que há uma pequena diferença de intensidade, indicando que a proteína está parcialmente solúvel. Em “P” está representada a amostra referente ao precipitado obtido após a lise das culturas bacterianas.

Ainda, foi realizado um imunensaio de *Western Blotting* utilizando as amostras da expressão conduzida a 20°C com as concentrações de 0,05mM e 0,1mM de IPTG. Para tanto, foram utilizados anticorpos primários específicos para a cauda de 6 histidinas presente na região N-terminal da proteína recombinante e anticorpos secundários específicos para os anticorpos primários conjugados à enzima fosfatase alcalina. Foi possível observar que a proteína recombinante, representada pela banda de aproximadamente 36kDa,

se apresentava solúvel em ambas as concentrações do indutor testadas, porém, bandas inespecíficas de menor massa molecular ainda estavam presentes, indicando que a redução da temperatura e diminuição da concentração de IPTG não possibilitaram a redução da expressão da proteína recombinante de maneira truncada (Figura 23).

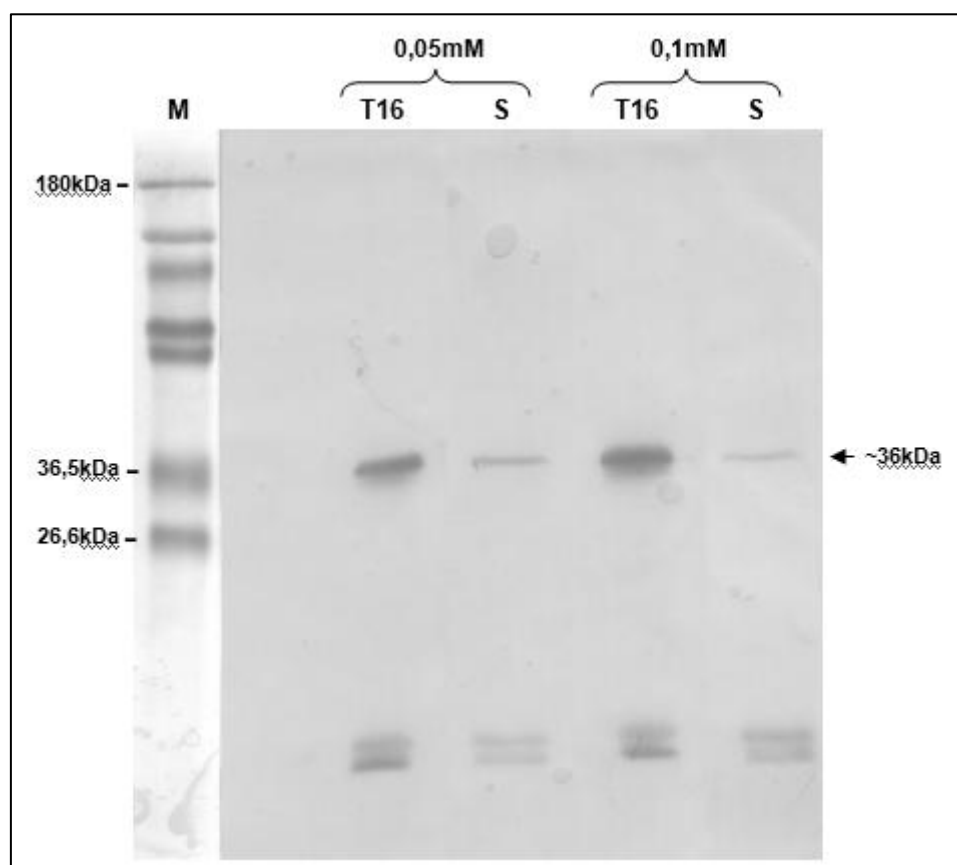


FIGURA 23 – ANÁLISE POR *WESTERN BLOTTING* DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/SUMO EXPRESSA EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 20°C UTILIZANDO A CEPA SHUFFLE T7 EXPRESS LYSY. Amostras referentes às expressões realizadas utilizando 0,05mM e 0,1mM de IPTG por 16 horas. As setas representam as bandas na altura de aproximadamente 36kDa referentes a LALP3 madura fusionada à proteína SUMO. Em “T16” está representado o tempo de expressão em horas e em “S” está representado o sobrenadante obtido após a lise da cultura bacteriana. Observa-se que em ambos os casos as amostras correspondentes ao sobrenadante “S” apresentam bandas com menor intensidade se comparadas às amostras representadas em “T16”, indicando que apenas uma fração da proteína recombinante estava solúvel.

5.6 Padronização das condições de expressão ideais da LALP3/SUMO em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS e BL21 STAR (DE3) One Shot.

Visto que a alteração nas condições de temperatura e concentração do indutor não resultaram em alto rendimento após a expressão da proteína

recombinante, bem como na redução da expressão da mesma de maneira truncada, optou-se pela realização da expressão da LALP3 madura fusionada à proteína SUMO nas cepas *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen) e BL21 STAR (DE3) One Shot (Invitrogen).

Após 4 horas desde a indução da expressão da proteína com IPTG foi possível observar a presença de uma banda na altura de aproximadamente 36kDa correspondente a LALP3 madura fusionada à proteína SUMO. Foi observado que as mini-expressões realizadas com todas as concentrações de IPTG avaliadas apresentaram um melhor rendimento após 4 horas de expressão se comparado com os resultados obtidos com a SHuffle T7 Express LysY (New England Biolabs). Ao analisar o perfil eletroforético das amostras referentes aos sobrenadantes obtidos após a lise das culturas bacterianas, foi possível observar uma banda de intensidade semelhante à banda observada após 4 horas de expressão, indicando que a proteína recombinante se apresentava solúvel frente às condições avaliadas. Contudo, ao avaliar as amostras referentes aos precipitados obtidos após a lise das culturas bacterianas, foi possível constatar que a proteína recombinante também se apresentava insolúvel agregada em corpos de inclusão (Figura 24 A, B, C, e D; e Figura 25 A, B e C).

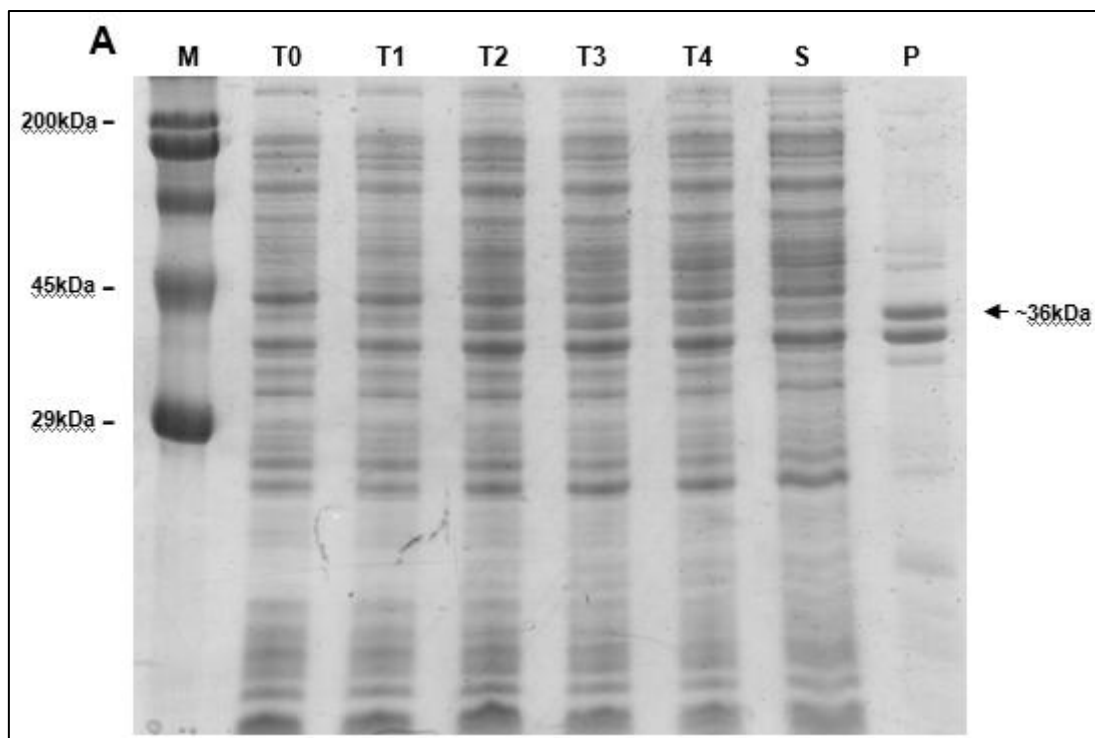


FIGURA 24 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/SUMO EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 30°C UTILIZANDO A CEPA BL21 (DE3) PLYSS. Expressões realizadas utilizando 0,1mM (A), 0,5mM (B), 1mM (C) e 2mM (D) de IPTG a 30°C. As setas representam as bandas na altura de aproximadamente 36kDa referentes a LALP3 madura fusionada à proteína SUMO. A marcação “T0” representa o início da indução e “T1”, “T2”, “T3” e “T4” indicam o tempo de expressão em horas. Verifica-se que a proteína foi expressa devido ao aumento da intensidade das bandas de ~36kDa ao longo do tempo. A amostra relativa ao sobrenadante está representada em “S”, sendo que ao comparar a banda obtida com a banda de “T0” observa-se que há uma pequena diferença de intensidade, indicando que a proteína está parcialmente solúvel. Em “P” está representada a amostra referente ao precipitado obtido após a lise das culturas bacterianas.

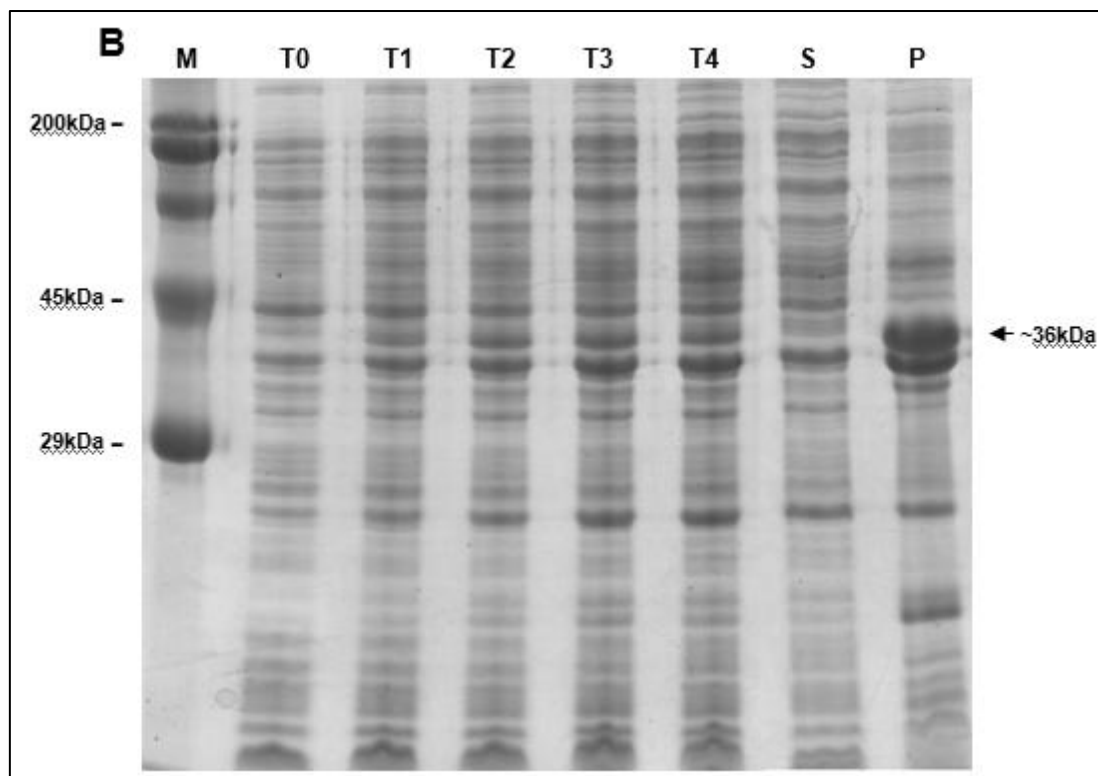


FIGURA 24 (CONTINUAÇÃO) – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/SUMO EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 30°C UTILIZANDO A CEPA BL21 (DE3) PLYSS. Expressões realizadas utilizando 0,1mM (A), 0,5mM (B), 1mM (C) e 2mM (D) de IPTG a 30°C. As setas representam as bandas na altura de aproximadamente 36kDa referentes a LALP3 madura fusionada à proteína SUMO. A marcação “T0” representa o início da indução e “T1”, “T2”, “T3” e “T4” indicam o tempo de expressão em horas. Verifica-se que a proteína foi expressa devido ao aumento da intensidade das bandas de ~36kDa ao longo do tempo. A amostra relativa ao sobrenadante está representada em “S”, sendo que ao comparar a banda obtida com a banda de “T0” observa-se que há uma pequena diferença de intensidade, indicando que a proteína está parcialmente solúvel. Em “P” está representada a amostra referente ao precipitado obtido após a lise das culturas bacterianas.

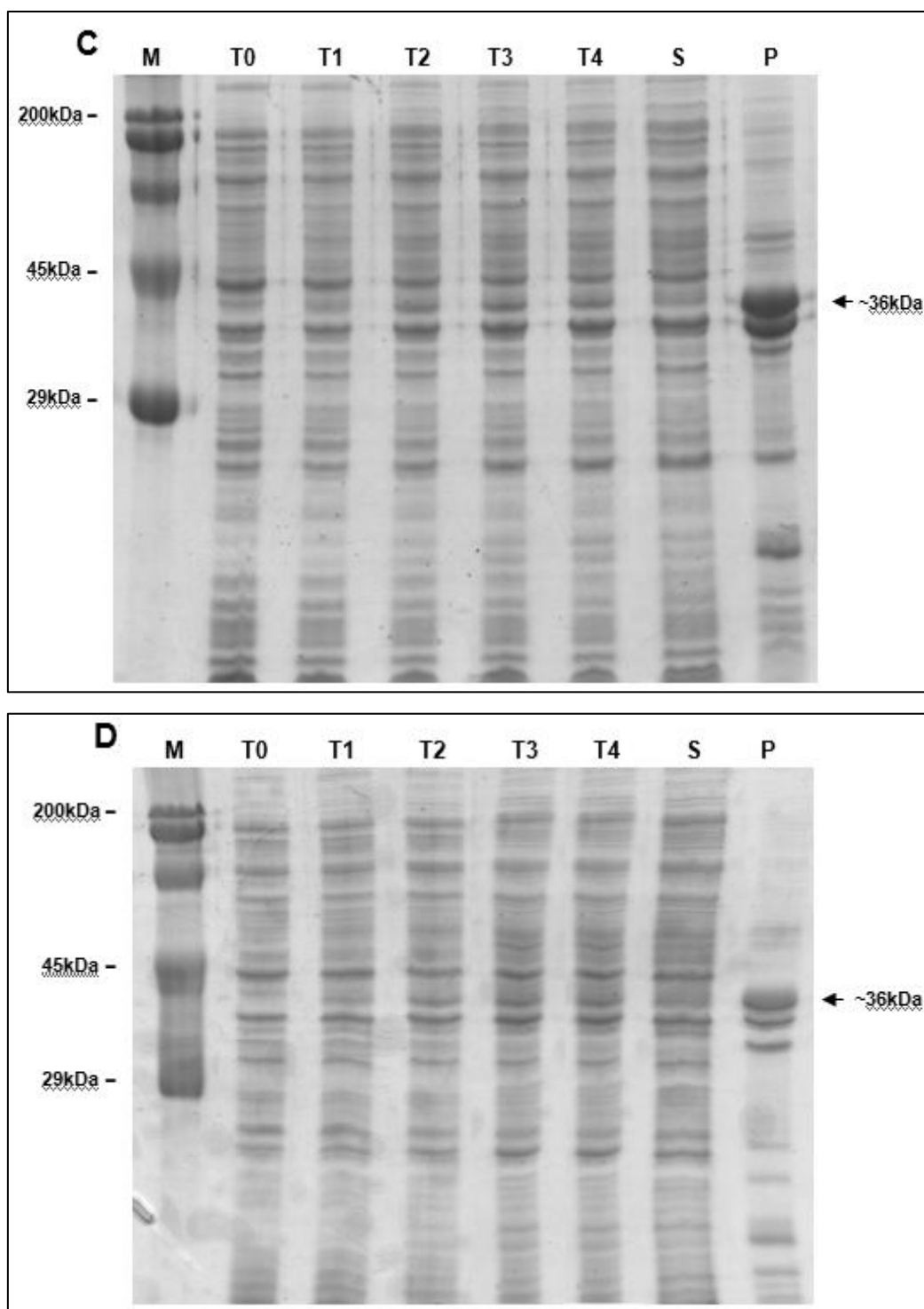


FIGURA 24 (CONTINUAÇÃO) – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/SUMO EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 30°C UTILIZANDO A CEPA BL21 (DE3) PLYSS. Expressões realizadas utilizando 0,1mM (A), 0,5mM (B), 1mM (C) e 2mM (D) de IPTG a 30°C. As setas representam as bandas na altura de aproximadamente 36kDa referentes a LALP3 madura fusionada à proteína SUMO. A marcação “T0” representa o início da indução e “T1”, “T2”, “T3” e “T4” indicam o tempo de expressão em horas. Verifica-se que a proteína foi expressa devido ao aumento da intensidade das bandas de ~36kDa ao longo do tempo. A amostra relativa ao sobrenadante está representada em “S”, sendo que ao comparar a banda obtida com a banda de “T0” observa-se que há uma pequena diferença de intensidade, indicando que a proteína está parcialmente solúvel. Em “P” está representada a amostra referente ao precipitado obtido após a lise das culturas bacterianas.

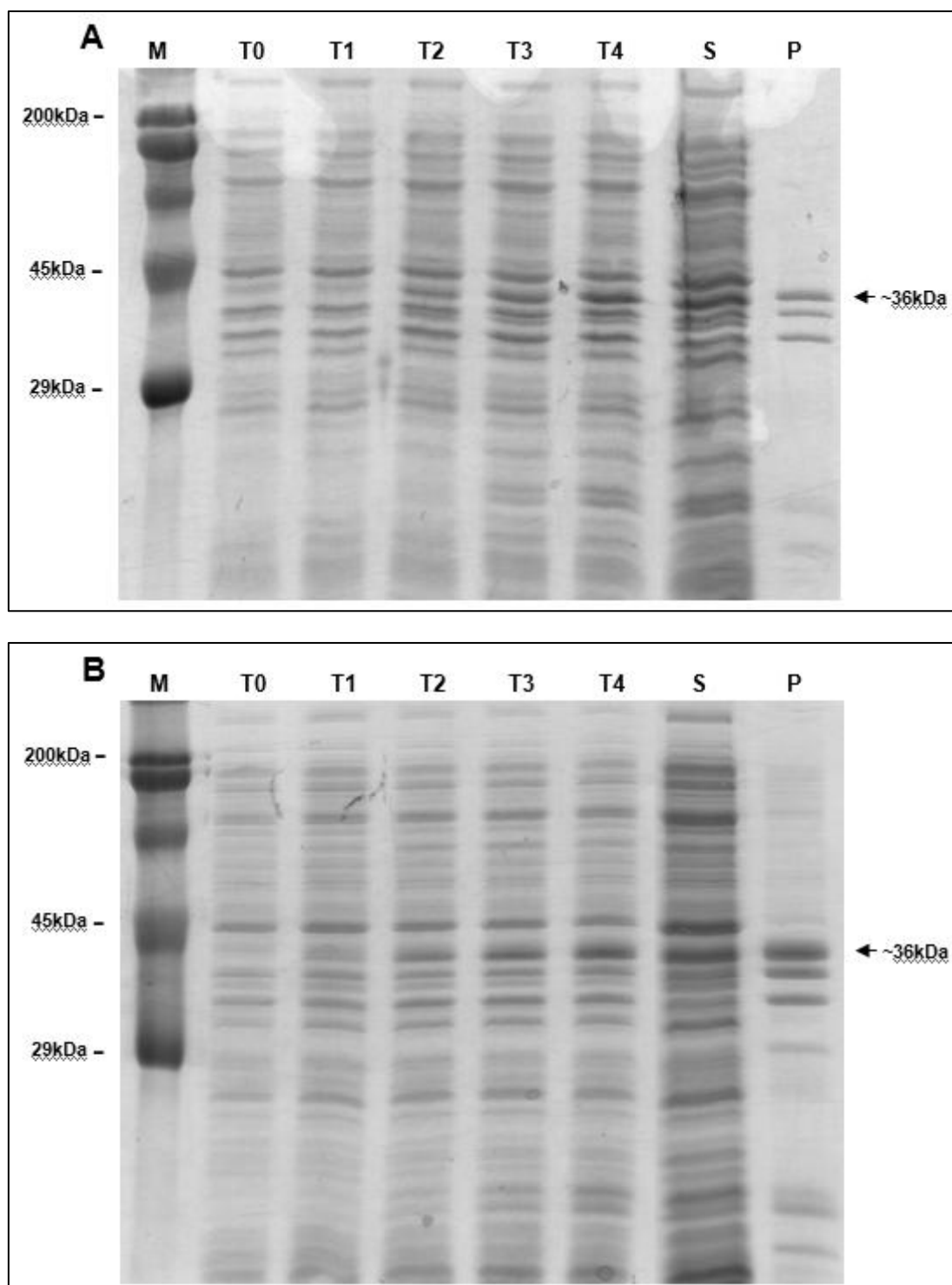


FIGURA 25 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/SUMO EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 30°C UTILIZANDO A CEPA BL21 STAR (DE3) ONE SHOT. Expressões realizadas utilizando 0,05mM (A), 0,1mM (B) e 0,5mM (C) de IPTG a 30°C. As setas representam as bandas na altura de aproximadamente 36kDa referentes a LALP3 madura fusionada à proteína SUMO. A marcação “T0” representa o início da indução e “T1”, “T2”, “T3” e “T4” indicam o tempo de expressão em horas. Verifica-se que a proteína foi expressa devido ao aumento da intensidade das bandas de ~36kDa ao longo do tempo. A amostra relativa ao sobrenadante está representada em “S”, sendo que ao comparar a banda obtida com a banda de “T0” observa-se que há uma pequena diferença de intensidade, indicando que a proteína está parcialmente solúvel. Em “P” está representada a amostra referente ao precipitado obtido após a lise das culturas bacterianas.

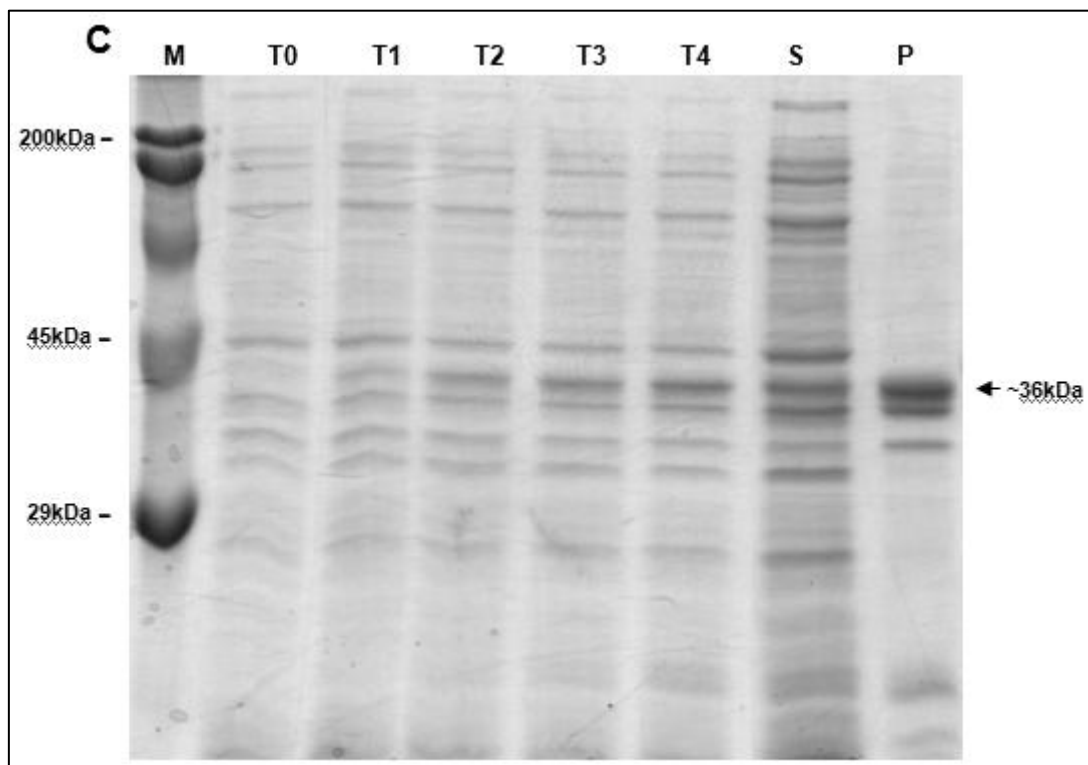


FIGURA 25 (CONTINUAÇÃO) – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/SUMO EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 30°C UTILIZANDO A CEPA BL21 STAR (DE3) ONE SHOT. Expressões realizadas utilizando 0,05mM (A), 0,1mM (B) e 0,5mM (C) de IPTG a 30°C. As setas representam as bandas na altura de aproximadamente 36kDa referentes a LALP3 madura fusionada à proteína SUMO. A marcação “T0” representa o início da indução e “T1”, “T2”, “T3” e “T4” indicam o tempo de expressão em horas. Verifica-se que a proteína foi expressa devido ao aumento da intensidade das bandas de ~36kDa ao longo do tempo. A amostra relativa ao sobrenadante está representada em “S”, sendo que ao comparar a banda obtida com a banda de “T0” observa-se que há uma pequena diferença de intensidade, indicando que a proteína está parcialmente solúvel. Em “P” está representada a amostra referente ao precipitado obtido após a lise das culturas bacterianas.

Tendo em vista a verificação da solubilidade da LALP3 madura fusionada à proteína SUMO após as expressões com as cepas BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen) e BL21 STAR (DE3) One Shot (Invitrogen), foram realizados imunoensaios de *Western Blotting* com as amostras resultantes das expressões realizadas com a cepa BL21 (DE3) pLysS. Foram utilizados anticorpos primários específicos para a cauda de 6 histidinas presente na região N-terminal da proteína recombinante e anticorpos secundários específicos para os anticorpos primários conjugados à enzima fosfatase alcalina. Os ensaios foram realizados com as amostras referentes aos sobrenadantes obtidos após a lise das culturas bacterianas das expressões as quais foram utilizadas as concentrações de 0,1mM, 0,5mM, 1mM e 2mM de

IPTG. Foi constatada a presença de bandas na altura de aproximadamente 36kDa referentes à LALP3 madura fusionada à proteína SUMO e bandas inespecíficas de menor massa molecular. Uma vez que os anticorpos primários utilizados reconhecem a cauda de 6 histidinas, sugere-se que as bandas de menor massa sejam correspondentes à proteína SUMO não fusionada à LALP3. Considerando as concentrações de IPTG utilizadas no teste de expressão, observou-se que as expressões realizadas com 0,1mM e 0,5mM do indutor resultaram em bandas de baixa intensidade, indicando pouca massa proteica na fração referente ao sobrenadante obtido após a lise da cultura bacteriana. Em contrapartida, nas expressões realizadas com 1mM e 2mM foi possível observar bandas de maior intensidade, especialmente na amostra referente à expressão induzida com 2mM. Contudo, foram observadas bandas inespecíficas abaixo de 36kDa em “T4” (Figura 26 A e B).

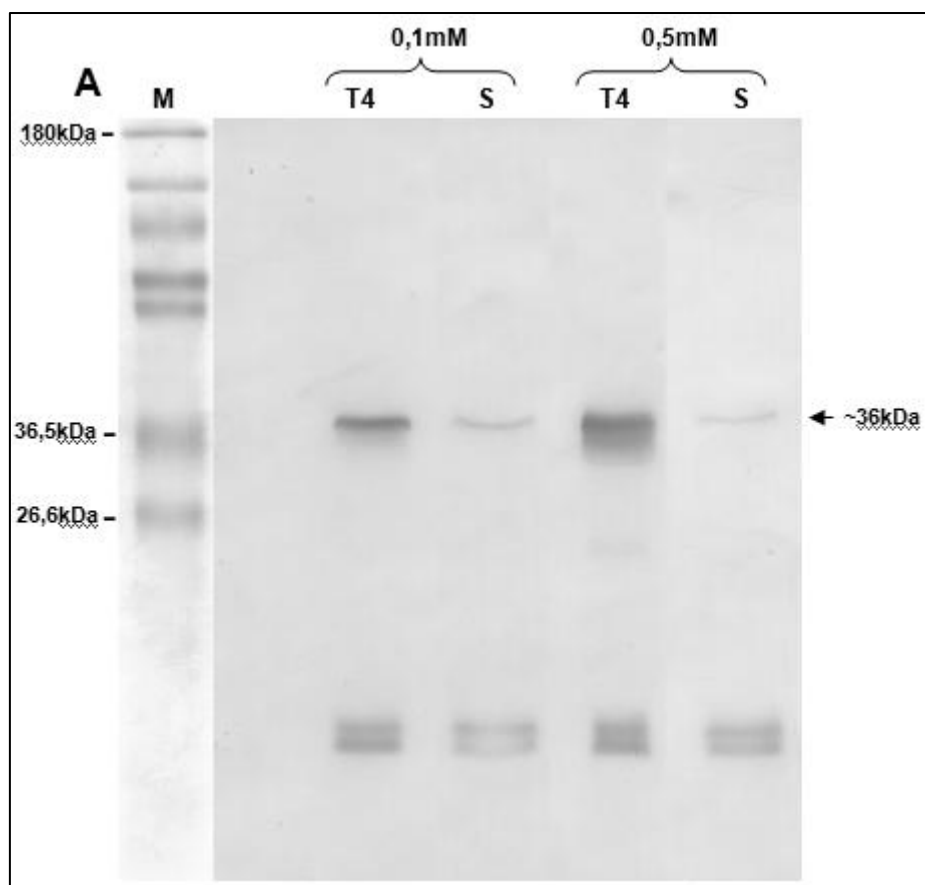


FIGURA 26 – ANÁLISE POR *WESTERN BLOTTING* DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/SUMO EXPRESSA EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 30°C UTILIZANDO A CEPA BL21 (DE3) PLYSS. Amostras referentes às expressões realizadas utilizando 0,1mM; 0,5mM (A); 1mM e 2mM (B) de IPTG. As setas representam as bandas na altura de aproximadamente 36kDa referentes a LALP3 madura fusionada à proteína SUMO. Em “T4” está representado o tempo de expressão em horas e em “S” está indicado o sobrenadante obtido após a lise da cultura bacteriana. Observa-se que em todos os casos as amostras correspondentes ao sobrenadante “S” apresentam bandas com menor intensidade se comparadas à amostra representada em “T4”, indicando que uma fração da proteína recombinante estava solúvel, de modo que 1mM e 2mM de IPTG apresentaram maior rendimento da LALP3 madura/SUMO na condição solúvel.

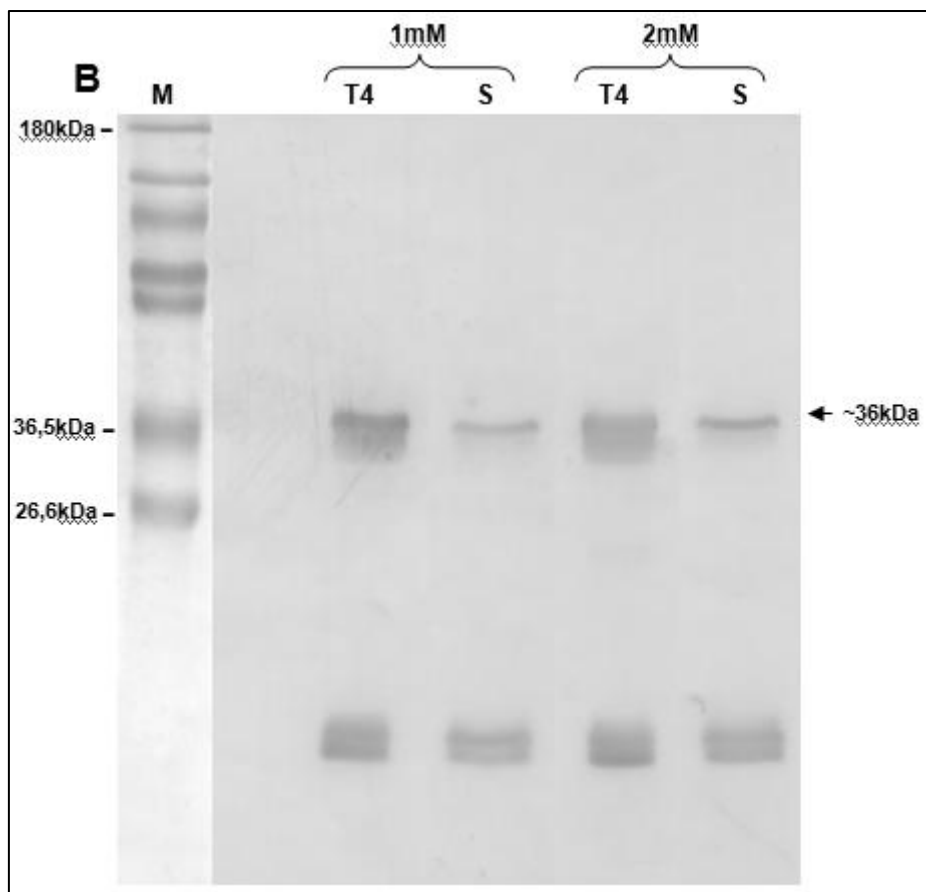


FIGURA 26 (CONTINUAÇÃO) – ANÁLISE POR *WESTERN BLOTTING* DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/SUMO EXPRESSA EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 30°C UTILIZANDO A CEPA BL21 (DE3) PLYSS. Amostras referentes às expressões realizadas utilizando 0,1mM; 0,5mM (A); 1mM e 2mM (B) de IPTG. As setas representam as bandas na altura de aproximadamente 36kDa referentes a LALP3 madura fusionada à proteína SUMO. Em “T4” está representado o tempo de expressão em horas e em “S” está indicado o sobrenadante obtido após a lise da cultura bacteriana. Observa-se que em todos os casos as amostras correspondentes ao sobrenadante “S” apresentam bandas com menor intensidade se comparadas à amostra representada em “T4”, indicando que uma fração da proteína recombinante estava solúvel, de modo que 1mM e 2mM de IPTG apresentaram maior rendimento da LALP3 madura/SUMO na condição solúvel.

Ainda, com a cepa BL21 STAR (DE3) One Shot (Invitrogen) foram realizados testes de mini-expressão utilizando o meio Triptona-Fosfato, 0,01mM e 0,05mM de IPTG a 20°C por 16 horas.

Após o tempo de expressão foi possível observar a presença de uma banda na altura de aproximadamente 36kDa correspondente a LALP3 madura fusionada à proteína SUMO. Foi observado que as mini-expressões realizadas com ambas as concentrações de IPTG avaliadas apresentaram bandas referentes ao fim da expressão (T16) com intensidade semelhante às bandas referentes ao início da expressão (T0), indicando que nas condições testadas a expressão da LALP3 fusionada a proteína SUMO é menor se comparado a

expressões com temperaturas e concentrações de IPTG maiores. Ao analisar o perfil eletroforético das amostras referentes aos sobrenadantes obtidos após a lise das culturas bacterianas, foi possível observar uma banda de intensidade semelhante à banda observada após 16 horas de expressão com ambas as concentrações de IPTG, indicando que mesmo com baixo nível de expressão, a proteína recombinante se apresentava parcialmente solúvel frente às condições avaliadas, de modo que ao avaliar as amostras referentes aos precipitados obtidos após a lise das culturas bacterianas, foi possível constatar que a proteína recombinante também se apresentava insolúvel agregada em corpos de inclusão (Figura 27 A e B).

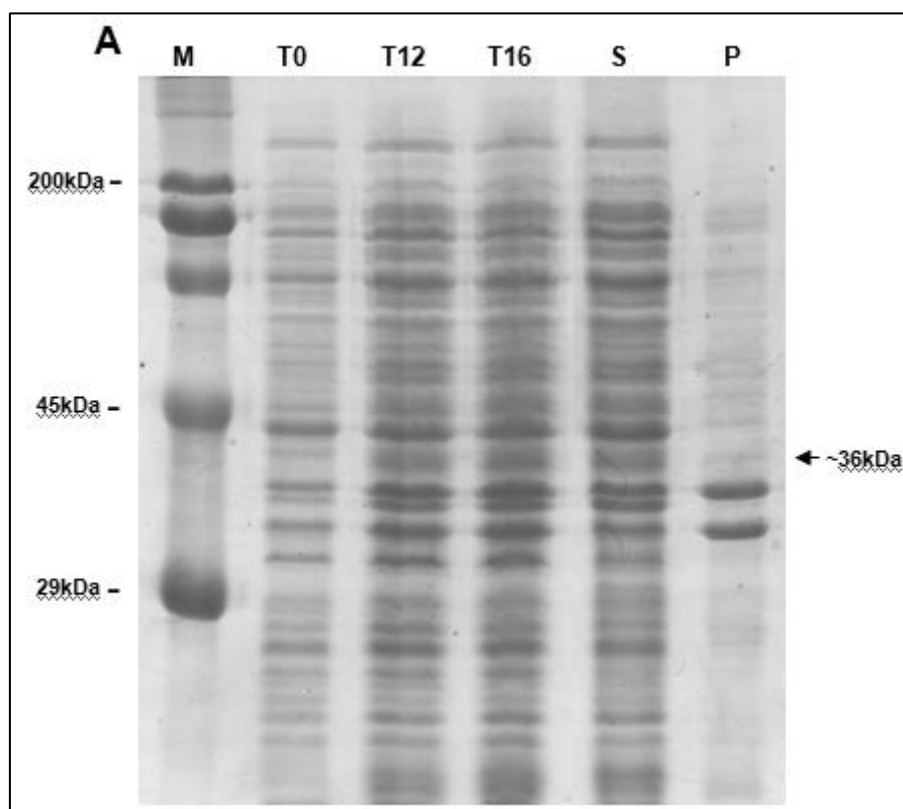


FIGURA 27 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/SUMO EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 20°C UTILIZANDO A CEPA BL21 STAR (DE3) ONE SHOT. Expressões realizadas utilizando 0,01mM (A) e 0,05mM (B) de IPTG a 20°C. As setas representam as bandas na altura de aproximadamente 36kDa referentes a LALP3 madura fusionada à proteína SUMO. A marcação “T0” representa o início da indução e “T12” e “T16” indicam o tempo de expressão em horas. Verifica-se que a proteína foi expressa devido ao aumento da intensidade das bandas de ~36kDa ao longo do tempo. A amostra relativa ao sobrenadante está representada em “S”, sendo que ao comparar a banda obtida com a banda de “T0” observa-se que há uma pequena diferença de intensidade, indicando que a proteína está parcialmente solúvel. Em “P” está representada a amostra referente ao precipitado obtido após a lise das culturas bacterianas, indicando que uma fração da proteína recombinante se apresenta na fração insolúvel.

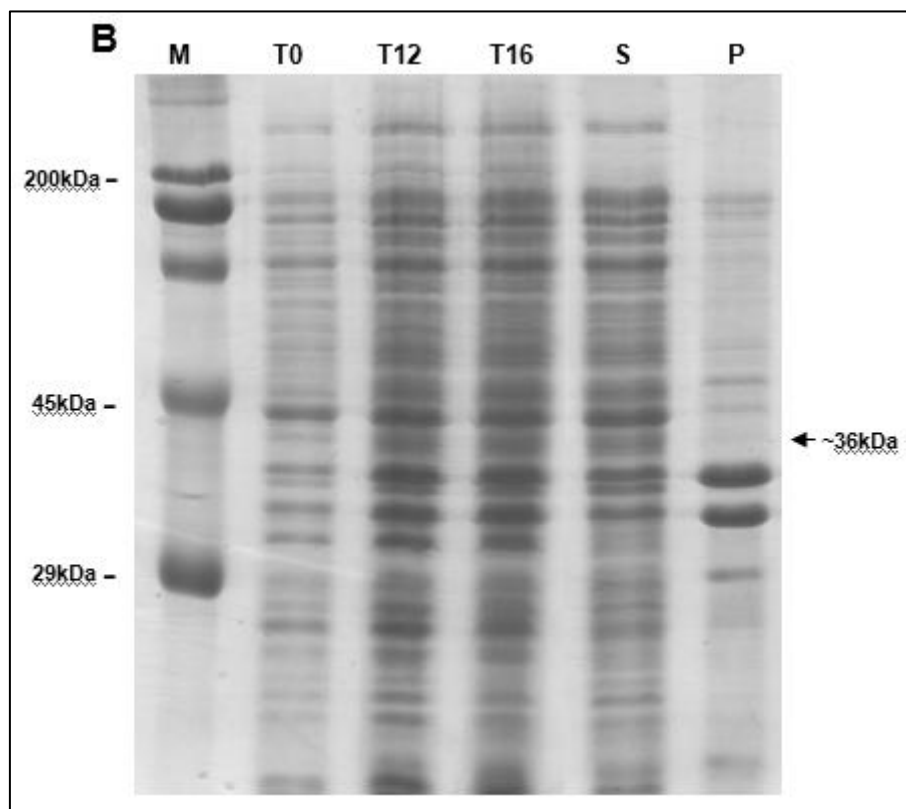


FIGURA 27 (CONTINUAÇÃO) – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DAS MINI-EXPRESSÕES DA LALP3/SUMO EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 20°C UTILIZANDO A CEPA BL21 STAR (DE3) ONE SHOT. Expressões realizadas utilizando 0,01mM (A) e 0,05mM (B) de IPTG a 20°C. As setas representam as bandas na altura de aproximadamente 36kDa referentes a LALP3 madura fusionada à proteína SUMO. A marcação “T0” representa o início da indução e “T12” e “T16” indicam o tempo de expressão em horas. Verifica-se que a proteína foi expressa devido ao aumento da intensidade das bandas de ~36kDa ao longo do tempo. A amostra relativa ao sobrenadante está representada em “S”, sendo que ao comparar a banda obtida com a banda de “T0” observa-se que há uma pequena diferença de intensidade, indicando que a proteína está parcialmente solúvel. Em “P” está representada a amostra referente ao precipitado obtido após a lise das culturas bacterianas, indicando que uma fração da proteína recombinante se apresenta na fração insolúvel.

5.7 Expressão da LALP3/SUMO em *E. coli* SHuffle T7 Express LysY em larga escala a 30°C.

Visto que os testes de mini-expressão realizados demonstraram que houve pouca diferença no rendimento da expressão da LALP3 madura fusionada à proteína SUMO nas cepas de *E. coli* utilizadas, optou-se por utilizar primeiramente a cepa SHuffle T7 Express LysY (New England Biolabs) – devido as propriedades da cepa - para expressar a proteína recombinante em

larga escala visando a purificação e realização de testes de atividade com a mesma.

A análise da expressão da LALP3 madura fusionada à proteína SUMO por SDS-PAGE 12,5% sob condições redutoras revelou que após 4 horas de expressão é possível observar uma banda de grande intensidade com massa de aproximadamente 36kDa se comparada com a banda observada na fração correspondente ao tempo zero de expressão, antes da adição do indutor (1mM IPTG). Ainda, ao observar a fração correspondente ao sobrenadante, é possível visualizar uma banda com massa de aproximadamente 36kDa com intensidade menor à da mesma banda visualizada na amostra em T4, indicando que a proteína recombinante foi parcialmente expressa na condição solúvel. De maneira semelhante, pode se observar a mesma banda na altura de aproximadamente 36kDa na fração correspondente ao precipitado, sugerindo que uma fração da LALP3 madura fusionada à proteína SUMO também é expressa na condição insolúvel, se agregando e formando corpos de inclusão (Figura 28).

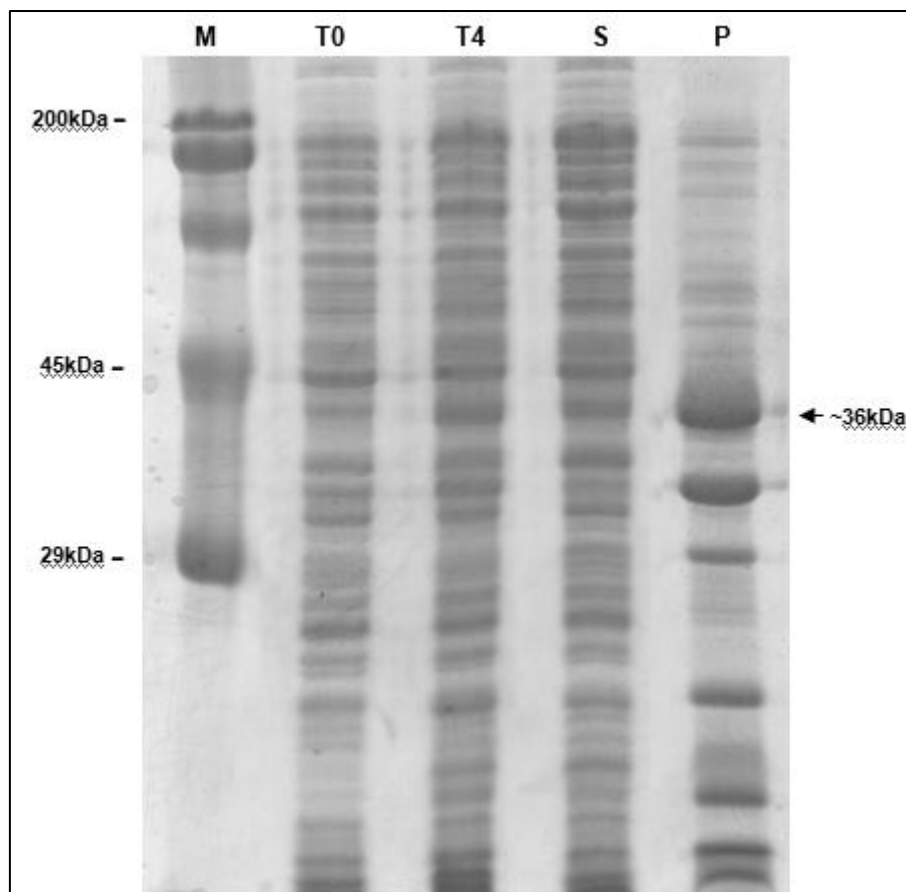


FIGURA 28 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DA EXPRESSÃO DA LALP3/SUMO EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 30°C UTILIZANDO A CEPA SHUFFLE T7 EXPRESS LYSY. Expressão realizada utilizando 1mM de IPTG a 30°C por 4 horas. As setas representam as bandas na altura de aproximadamente 36kDa referentes a LALP3 madura fusionada à proteína SUMO. A marcação “T0” representa o início da indução e “T4” indica o tempo em horas ao término da expressão. A amostra relativa ao sobrenadante está representada em “S”, sendo que ao comparar a banda obtida com a banda de “T0” observa-se que há diferença de intensidade, indicando que a proteína está parcialmente solúvel. Em “P” está representada a amostra referente ao precipitado obtido após a lise das culturas bacterianas, onde é possível observar a presença de uma banda indicando que uma fração da proteína recombinante também foi expressa na condição insolúvel.

5.8 Expressão da LALP3 madura /SUMO em *E. coli* BL21 STAR (DE3) One Shot em larga escala a 30°C

Tendo em vista que a expressão em larga escala utilizando a cepa SHuffle T7 Express LysY (New England Biolabs) não resultou em alto rendimento da proteína recombinante, optou-se por utilizar a cepa BL21 STAR (DE3) One Shot (Invitrogen), uma vez que uma de suas características é promover o maior rendimento em expressões de proteínas recombinantes.

A análise da expressão da LALP3 madura fusionada à proteína SUMO por SDS-PAGE 12,5% sob condições redutoras revelou que após 4 horas de

expressão é possível observar uma banda com massa de aproximadamente 36kDa de grande intensidade se comparada com a banda observada na fração correspondente ao início da expressão, antes da adição do indutor (0,05mM IPTG). Ainda, ao observar a fração correspondente ao sobrenadante, é possível visualizar uma banda com massa de aproximadamente 36kDa com intensidade semelhante à da mesma banda visualizada na amostra em T4, indicando que a proteína recombinante foi expressa na condição solúvel e com maior rendimento se comparado com os dados obtidos da expressão em SHuffle T7 Express LysY (New England Biolabs). Também foi possível observar a mesma banda na altura de aproximadamente 36kDa na fração correspondente ao precipitado, sugerindo que uma fração da LALP3 madura fusionada à proteína SUMO ainda permanece sendo expressa na condição insolúvel (Figura 29).

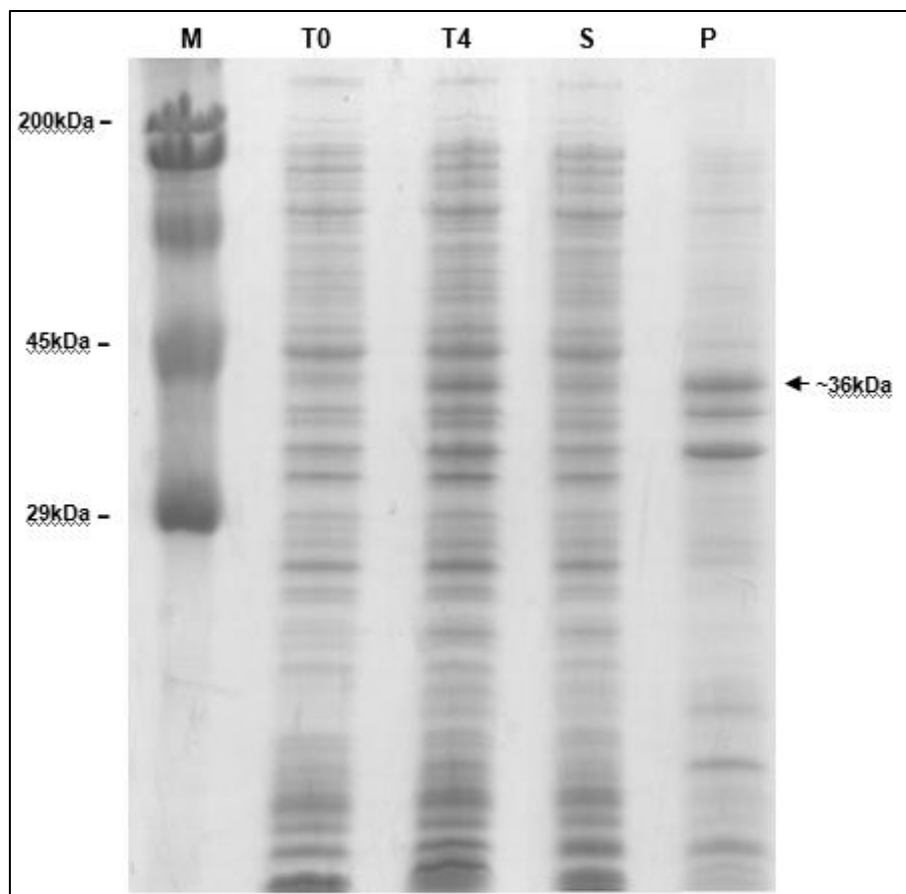


FIGURA 29 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DA EXPRESSÃO DA LALP3/SUMO EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 30°C UTILIZANDO A CEPA BL21 STAR (DE3) ONE SHOT. Expressão realizada utilizando 0,05mM de IPTG a 30°C por 4 horas. As setas representam as bandas na altura de aproximadamente 36kDa referentes a LALP3 madura fusionada à proteína SUMO. A marcação “T0” representa o início da indução e “T4” indica o tempo em horas ao término da expressão. A amostra relativa ao sobrenadante está representada em “S”, sendo que ao comparar a banda obtida com a banda de “T0” observa-se que há pouca diferença de intensidade, indicando que a proteína recombinante está representada por uma fração solúvel. Em “P” está representada a amostra referente ao precipitado obtido após a lise das culturas bacterianas, onde é possível observar a presença de uma banda indicando que a maior massa da proteína recombinante foi expressa na condição insolúvel.

5.9 Purificação da LALP3/SUMO por cromatografia de afinidade com resina de Ni-NTA agarose em condições nativas

Foi realizada a purificação da proteína recombinante obtida após a expressão em SHuffle T7 Express LysY (New England Biolabs) por cromatografia de afinidade utilizando resina composta por *beads* de Ni-NTA Agarose (QIAGEN). Brevemente, a amostra foi incubada com a resina de Ni-NTA Agarose previamente equilibrada com tampão de ligação contendo 10mM de imidazol. Após diversas lavagens com tampão de maior estringência

contendo 20mM de imidazol, procedeu-se com a eluição da proteína recombinante com o uso do tampão de eluição contendo 250mM de imidazol.

Após a eluição da LALP3 madura fusionada à proteína SUMO, foram realizadas diálises contra tampão PBS e então seguiu-se como um ensaio de dosagem de proteínas pelo método de Bradford descrito no item 4.23 em Material e Métodos.

Foi observado que a concentração da proteína recombinante expressa em SHuffle T7 Express LysY (New England Biolabs) era de 0,5mg/mL em 4mL de solução após a eluição e diálises. Desta forma, em dois litros de cultura bacteriana foi possível obter aproximadamente 2mg da proteína recombinante. Em seguida foi realizada a concentração do produto eluído em filtro Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit (Milipore) com limite de 30kDa. Após a passagem do volume total obtido após a eluição (4mL) pelo filtro Amicon, o volume final obtido foi de 500µL. Uma nova dosagem de proteínas pelo método de Bradford foi realizada, onde foi obtida a concentração de 3,6mg/mL de proteína recombinante. A análise da pureza do produto eluído foi realizada através de um SDS-PAGE 12,5% sob condições redutoras, onde foi possível observar contaminantes de massa molecular variando de aproximadamente 15kDa a 50kDa. Ainda, a banda esperada com massa molecular de aproximadamente 36kDa referente a LALP3 madura fusionada à proteína SUMO foi observada com baixa intensidade. Contrariamente, duas bandas distintas com massa aproximada de 18kDa e 24kDa foram observadas com intensidade maior em relação às outras bandas observadas. Uma vez que a purificação por afinidade tem como princípio a purificação de proteínas contendo uma etiqueta de 6 histidinas em sequência, acredita-se que a banda observada em 18kDa seja correspondente à proteína SUMO e a banda observada em 24kDa à LALP3 madura, demonstrando a clivagem da LALP3 madura/SUMO decorrente de ação de enzimas proteolíticas bacterianas. Além disso, outras bandas foram visualizadas, de modo que estas podem ser resultado do truncamento da proteína durante a expressão ou contaminantes provenientes da própria cepa bacteriana utilizada (Figura 30).

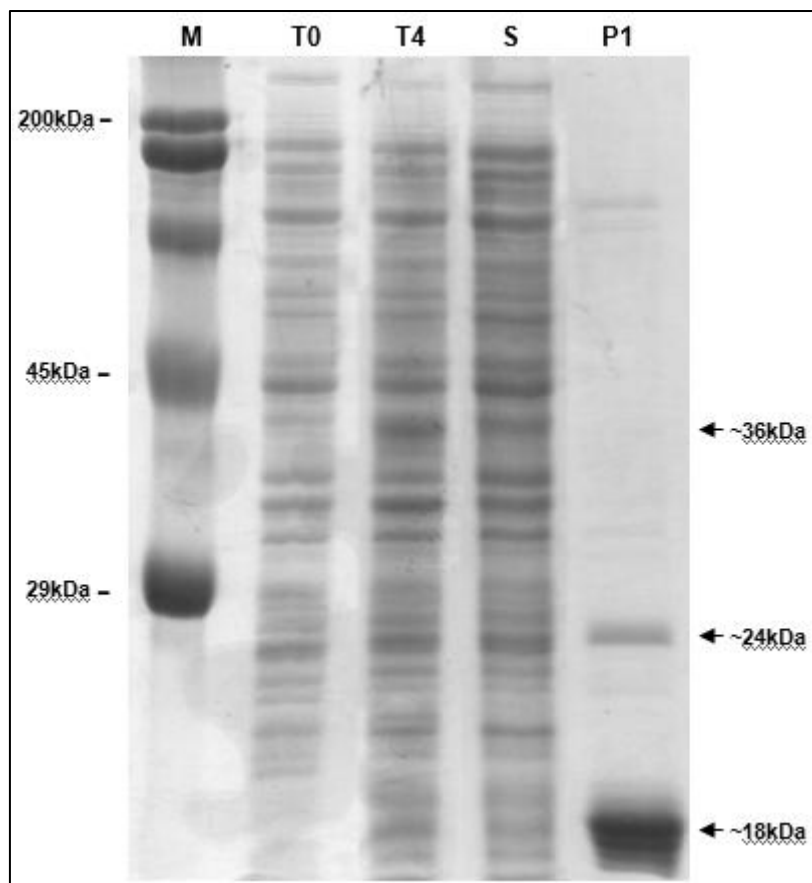


FIGURA 30 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DA PURIFICAÇÃO DA LALP3/SUMO APÓS EXPRESSÃO EM SHUFFLE T7 EXPRESS LYSY. Purificação realizada após expressão utilizando 1mM de IPTG a 30°C por 4 horas. A marcação “T0” representa o início da expressão e “T4” indica o tempo em horas ao término da expressão. A amostra relativa ao sobrenadante está representada em “S”. Em “P1” está representada a amostra obtida após a purificação em resina de Ni-NTA Agarose e passagem por filtro Amicon com limite de 30kDa. As setas representam as massas moleculares aproximadas da LALP3 madura fusionada à proteína SUMO (36kDa), da LALP3 madura (24kDa) e da proteína SUMO (18kDa). É possível observar a presença de bandas de menor intensidade indicando a presença de contaminantes bacterianos.

A purificação da proteína recombinante expressa em BL21 STAR (DE3) One Shot (Invitrogen) foi realizada da mesma forma como citado no item 4.22 de Material e Métodos. Após a dosagem pelo método de Bradford, foi observado que a concentração da proteína após a eluição e diálises era de 0,450mg/ml em 2mL de solução contendo a LALP3 madura. Através de um SDS-PAGE 12,5% sob condições redutoras foi possível visualizar duas bandas com maior intensidade, a primeira com massa de aproximadamente 24kDa, representada possivelmente pela LALP3 madura livre da proteína SUMO; e a segunda com massa de aproximadamente 18kDa, estando relacionada à proteína SUMO livre da proteína recombinante fusionada. Desta forma, foi verificado que a clivagem da LALP3 madura associada a proteína SUMO não

foi bloqueada pelo inibidor de cisteíno-proteases Iodoacetamida na concentração de 10mM incubado com a amostra antes da purificação. Bandas inespecíficas com massa de aproximadamente 90kDa também foram observadas, de modo que estas podem representar contaminantes bacterianos (Figura 31).

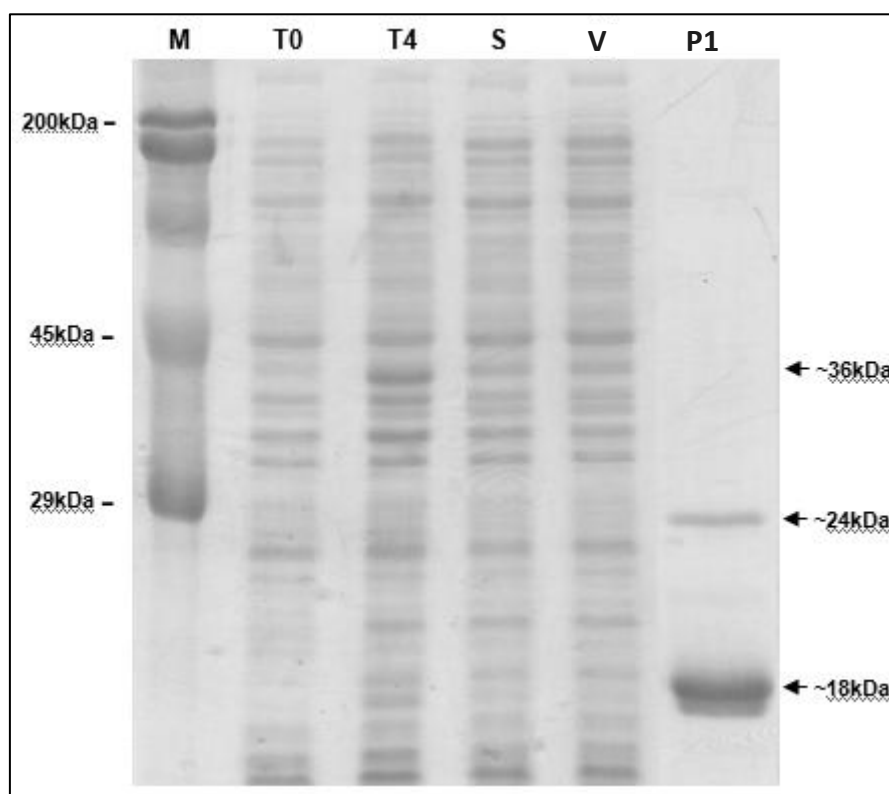


FIGURA 31 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DA PURIFICAÇÃO DA LALP3/SUMO APÓS EXPRESSÃO EM BL21 STAR (DE3) ONE SHOT. Purificação realizada após expressão utilizando 0,05mM de IPTG a 30°C por 4 horas. A marcação “T0” representa o início da expressão e “T4” indica o tempo em horas ao término da expressão. A amostra relativa ao sobrenadante está representada em “S”. Em “P1” está representada a amostra obtida após a purificação em resina de Ni-NTA Agarose. As setas representam as massas moleculares aproximadas da LALP3 madura fusionada à proteína SUMO (36kDa), da LALP3 madura (24kDa) e da proteína SUMO (18kDa). Em “V” está representado o “Void”, constituído da amostra referente à proteínas que não ligaram na resina de Ni-NTA Agarose, onde é possível verificar uma fração da LALP3/SUMO que não se ligou na resina.

Visando a confirmação de que a LALP3 fusionada à proteína SUMO obtida após a purificação em resina de Ni-NTA Agarose, foi realizado um imunensaio de *Western Blotting* com a amostra purificada após expressão em cepa BL21 STAR (DE3) One Shot (Invitrogen). Foram utilizados os anticorpos primários α -His tag e α -LALP, sendo que os anticorpos secundários foram o

anti IgG de camundongos e anti IgG de coelhos, como descrito no item 4.21 de Materiais e Métodos.

Foi possível observar que a proteína recombinante LALP3 livre da proteína SUMO, representada pela banda de aproximadamente 24kDa, foi observada apenas na amostra incubada com o anticorpo α -LALP. Ainda, bandas inespecíficas com massas moleculares variadas foram observadas, indicando a presença de contaminantes bacterianos na amostra, os quais também são reconhecidos por este anticorpo. Ao analisar as amostras que foram incubadas com o anticorpo α -His tag, foi possível observar uma banda com massa molecular aproximada de 18kDa referente à proteína SUMO livre da proteína LALP3 recombinante. Desta forma, é possível afirmar que a proteína recombinante LALP3 se apresenta livre da proteína SUMO e na condição solúvel, sendo assim possível a realização de testes para a avaliação da atividade proteolítica da enzima (Figura 32).

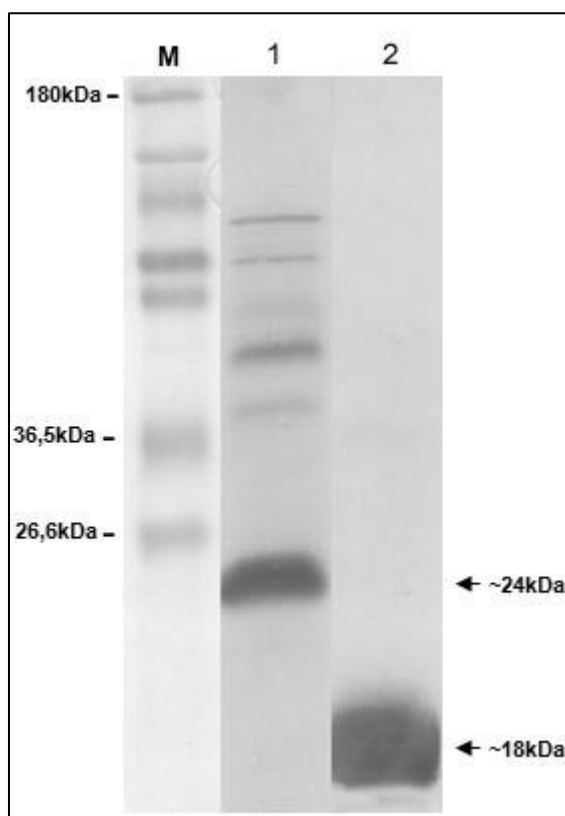


FIGURA 32 – ANÁLISE POR *WESTERN BLOTTING* DA LALP3/SUMO APÓS PURIFICAÇÃO EM RESINA NI-NTA AGAROSE. Em 1 está representada a amostra incubada com o anticorpo α -LALP. É possível observar contaminantes bacterianos reconhecidos pelo mesmo anticorpo. Em 2 está representada a amostras incubada com o anticorpo α -His tag. As setas representam as bandas nas alturas de aproximadamente 24kDa referente a LALP3 madura e 18kDa referente à proteína SUMO.

Para melhor visualização de dados, as tabelas 2 e 3 representam as condições de mini-expressão e expressão utilizadas.

Tabela 2. Condições de mini-expressão da LALP3 madura

Construção	Cepa	Meio de cultura	[] IPTG	Expressão	Temp
LALP3 pET20b+	Shuffle	LB	0,05 / 0,1 / 0,5mM	4 horas	30°C
LALP3 pET20b+	Shuffle	Tri-Fosf	0,05 / 0,1 / 0,5mM	4 horas	30°C
LALP3 pET20b+	Shuffle	Tri-Fosf	0,5mM	16 horas	20°C
LALP3 pET20b+	Shuffle	Tri-Fosf	0,5mM	24 horas	20°C
LALP3 SUMO	BL21 (DE3) pLysS	Tri-Fosf	0,1 / 0,5 / 1 / 2mM	4 horas	30°C
LALP3 SUMO	Shuffle	Tri-Fosf	0,05 / 0,1 / 0,5 / 1 / 2mM	4 horas	30°C
LALP3 SUMO	Shuffle	Tri-Fosf	0,05 / 0,1mM	16 horas	20°C
LALP3 SUMO	BL21 (DE3) Star	Tri-Fosf	0,05 / 0,1 / 0,5mM	4 horas	30°C
LALP3 SUMO	BL21 (DE3) Star	Tri-Fosf	0,01 / 0,05mM	16 horas	20°C

Tabela 3. Condições de expressão em larga escala da LALP3 madura

Tabela de Expressões LALP3 madura em larga escala (culturas 1L)					
Construção	Cepa	Meio de cultura	[] IPTG	Expressão	Temp.
LALP3 SUMO	Shuffle	Tri-Fosf	1mM	4 horas	30°C
LALP3 SUMO	BL21 (DE3) Star	Tri-Fosf	0,05mM	4 horas	30°C
LALP3 SUMO	BL21 (DE3) Star	Tri-Fosf	0,05mM (com iodoacetamida)	4 horas	30°C
LALP3 SUMO	BL21 (DE3) Star	Tri-Fosf	0,05mM	4 horas	37°C

Uma vez que o resultado das purificações das amostras obtidas após expressões em cepas SHuffle T7 Express LysY (New England Biolabs) e BL21 STAR (DE3) One SHot (Invitrogen) demonstrou que a proteína recombinante foi purificada na condição solúvel em ambos os casos, optou-se por realizar testes de atividade com a LALP3 purificada a partir da expressão realizada em SHuffle T7 Express LysY (New England Biolabs).

5.10 Avaliação da atividade fibrinogenolítica da LALP3/SUMO obtida em SHuffle T7 Express LysY

Ao analisar o resultado de degradação do fibrinogênio pela LALP3 madura foi possível verificar que as amostras referentes aos controles negativos “C” e “C” (fibrinogênio na ausência de proteases) e “P1” (fibrinogênio + fosfolipase 1 recombinante) apresentaram o mesmo padrão de bandas, sendo possível visualizar as bandas referentes às cadeias B β e γ da molécula de fibrinogênio, demonstrando que a mesma não sofreu proteólise. A amostra do controle negativo “Vn+ini” (veneno + fenantrolina) apresentou atividade parcial sobre o substrato, demonstrando que a quantidade de inibidor utilizado resultou na inibição parcial de metaloproteases presentes no veneno de *L. intermedia*. Contrariamente, ao analisar a amostra referente ao controle positivo “Vn” (fibrinogênio + veneno) foi possível observar a degradação completa do substrato, uma vez que foi visualizada apenas a banda referente a cadeia γ do substrato. No entanto, ao analisar as amostras referentes aos testes “L3 1:2,5” (LALP3/SUMO 5 μ g) e “L3 1:1” (LALP3 madura 12,5 μ g), não foi possível verificar a degradação do substrato, demonstrando que a proteína recombinante apesar de estar solúvel não apresenta a condição de dobramento correta para permitir a atividade catalítica da enzima (Figura 33).

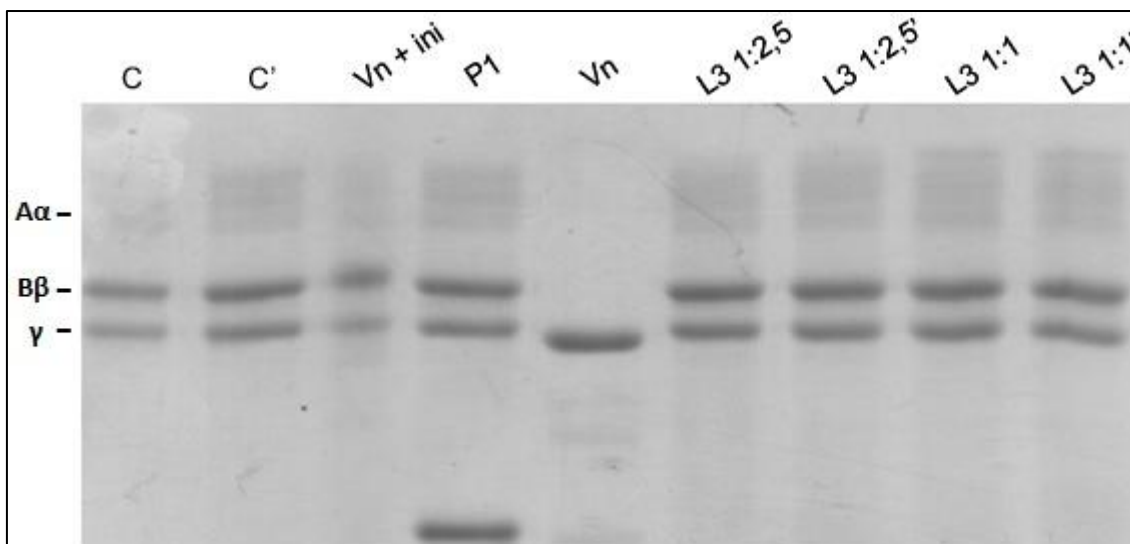


FIGURA 33 – AVALIAÇÃO DO EFEITO FIBRINOGENOLÍTICO DA LALP3/SUMO. A proteína recombinante obtida após expressão em SHuffle T7 Express LysY foi incubada com fibrinogênio por 16h a 37°C. Como controle negativo foi utilizado: fibrinogênio (12,5µg) livre de proteases sem incubação por 16h (C) e incubado por 16h (C'); fibrinogênio incubado com veneno e 1,10-fenantrolina (Vn+ini); e fibrinogênio incubado com fosfolipase 1 de *L. intermedia* recombinante - 5µg (P1). Como controle positivo foi utilizado fibrinogênio incubado com veneno - 5µg (Vn), onde foi possível observar a degradação da cadeia Bβ do substrato. Os testes realizados com a LALP3/SUMO - 5µg incubada com fibrinogênio não demonstraram atividade proteolítica da proteína recombinante (L3 1:2,5 e L3 1:2,5'). O mesmo ocorreu com as amostras onde foi utilizada a LALP3 na concentração de 12,5µg (L3 1:1 e L3 1:1').

5.11 Avaliação da atividade da LALP3/SUMO obtida em SHuffle T7 Express LysY sobre colágeno tipo I desnaturado

Ao analisar o resultado da degradação do colágeno tipo I desnaturado pela LALP3/SUMO foi possível verificar que as amostras referentes aos controles negativos “C” (colágeno na ausência de proteases), “C'” (colágeno na ausência de proteases preparado no momento da aplicação do gel), “Vn+ini” (veneno + colágeno + inibidores), “P1” (colágeno + fosfolipase 1 recombinante), “col+ini” (colágeno + inibidores) e “col+ZnSO₄ e CaCl₂” (colágeno + ZnSO₄ e CaCl₂) apresentaram o mesmo padrão de bandas, sendo possível visualizar as bandas referentes às cadeias α1, α2 e os dímeros da cadeia β da molécula de colágeno tipo I desnaturado, demonstrando que a mesma não sofreu proteólise. O controle negativo “Vn+ini” (veneno + colágeno + inibidores) demonstrou que o veneno degradou parcialmente as cadeias α2 e β da molécula de colágeno, sendo que a amostra “Vn” (veneno + colágeno) demonstrou total degradação da molécula pelo veneno. Já os grupos teste “L3 1:5” (LALP3/SUMO + colágeno 1:5), “L3 1:2” (LALP3/SUMO + colágeno 1:2),

“L3 1:2+ini” (LALP3/SUMO + colágeno + inibidores), “L3 1:2+ZnSO₄” (LALP3/SUMO + colágeno 1:2 + ZnSO₄) e “L3 1:2+CaCl₂” (LALP3/SUMO + colágeno 1:2 + CaCl₂) não demonstraram sinais de degradação de nenhuma das cadeias do colágeno tipo I desnaturado, indicando que a proteína recombinante não possui atividade sobre este substrato nas condições em que foi expressa e purificada (Figura 34 A e B).

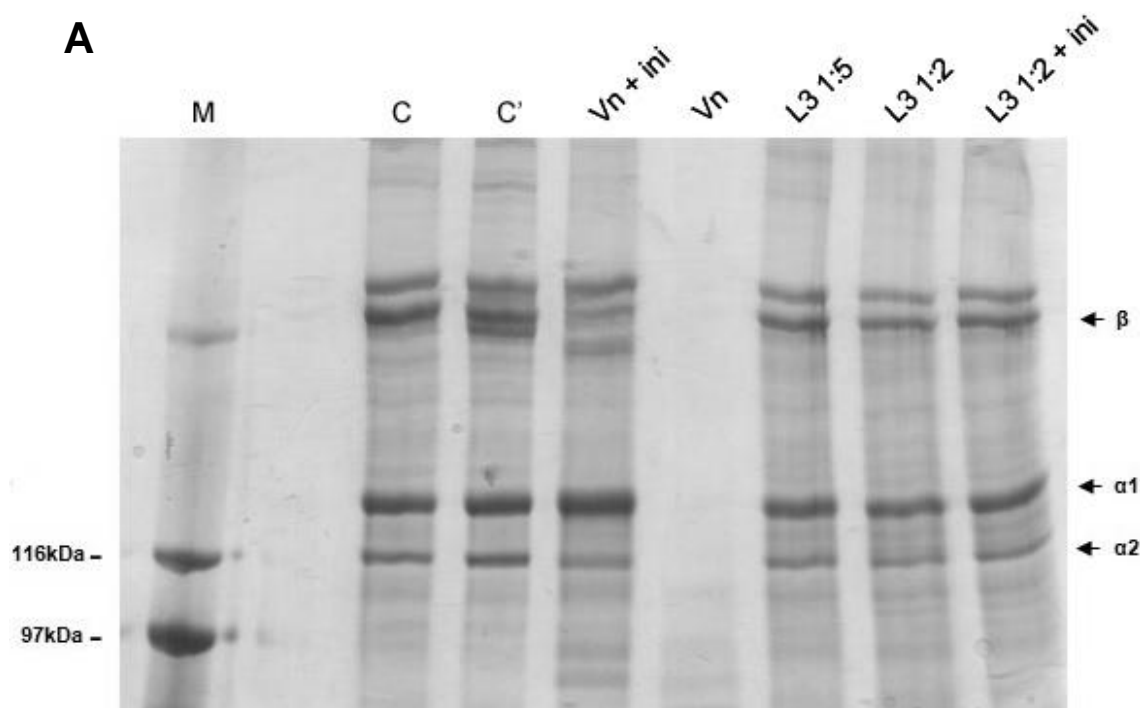


FIGURA 34 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DA LALP3/SUMO SOBRE COLÁGENO TIPO I DESNATURADO. A proteína recombinante obtida após expressão em SHuffle T7 Express LysY foi incubada com colágeno tipo I desnaturado por 16h a 37°C. Como controle negativo foi utilizado: colágeno tipo I desnaturado (15µg) livre de proteases incubado por 16h (C) e sem preparado logo antes da aplicação ao gel (C'); colágeno tipo I desnaturado incubado com veneno e inibidores (Vn+ini); colágeno tipo I desnaturado incubado com fosfolipase 1 de *L. intermedia* recombinante 1:5 (P1); colágeno tipo I desnaturado incubado com inibidores (col+ini) e colágeno tipo I desnaturado incubado com ZnSO₄ e CaCl₂ (col+ZnSO₄ e CaCl₂). Como controle positivo foi utilizado colágeno tipo I desnaturado incubado com veneno 1:5 (Vn), onde foi possível observar a degradação das cadeias α2 e β do substrato. Os testes realizados com a LALP3 madura incubada com colágeno tipo I desnaturado 1:5 (L3 1:5) e 1:2 (L3 1:2), na presença de inibidores 1:2 (L3 1:2+ini) e na presença de ZnSO₄ (L3 1:2+ZnSO₄) e CaCl₂ (L3 1:2+CaCl₂) não demonstraram atividade proteolítica da proteína recombinante.

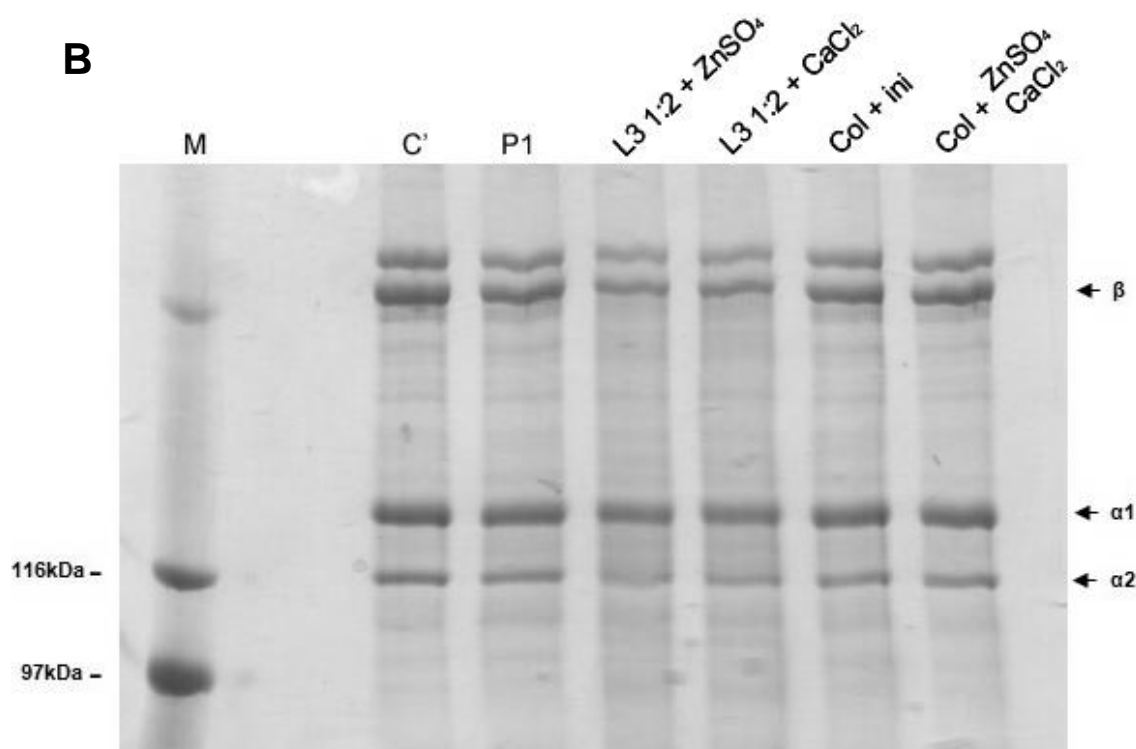


FIGURA 34 (CONTINUAÇÃO) – AVALIAÇÃO DO EFEITO DA LALP3/SUMO SOBRE COLÁGENO TIPO I DESNATURADO. A proteína recombinante obtida após expressão em SHuffle T7 Express LysY foi incubada com colágeno tipo I desnaturado por 16h a 37°C. Como controle negativo foi utilizado: colágeno tipo I desnaturado (15µg) livre de proteases incubado por 16h (C) e sem preparado logo antes da aplicação ao gel (C'); colágeno tipo I desnaturado incubado com veneno e inibidores (Vn+ini); colágeno tipo I desnaturado incubado com fosfolipase 1 de *L. intermedia* recombinante 1:5 (P1); colágeno tipo I desnaturado incubado com inibidores (col+ini) e colágeno tipo I desnaturado incubado com ZnSO₄ e CaCl₂ (col+ZnSO₄ e CaCl₂). Como controle positivo foi utilizado colágeno tipo I desnaturado incubado com veneno 1:5 (Vn), onde foi possível observar a degradação das cadeias α2 e β do substrato. Os testes realizados com a LALP3 madura incubada com colágeno tipo I desnaturado 1:5 (L3 1:5) e 1:2 (L3 1:2), na presença de inibidores 1:2 (L3 1:2+ini) e na presença de ZnSO₄ (L3 1:2+ZnSO₄) e CaCl₂ (L3 1:2+CaCl₂) não demonstraram atividade proteolítica da proteína recombinante.

5.12 Avaliação da atividade da LALP3/SUMO obtida em SHuffle T7 Express LysY sobre a azocaseína

Os resultados do ensaio de degradação da azocaseína estão representados na Figura 35. Foi verificado que proteases do veneno de *L. intermedia* possuem ação proteolítica sobre a azocaseína, de modo que os valores de absorbância obtidos foram superiores aos valores obtidos nas amostras incubadas apenas com PBS livre de proteases. Para confirmar a ação de metaloproteases do veneno sobre a azocaseína foi realizado um teste utilizando o inibidor 1,10-fenantrolina. Foi observado que os valores de

absorbância obtidos para as amostras onde foi utilizado o veneno na presença do inibidor foram menores se comparado com os dados obtidos com o veneno. Desta forma, foi possível observar que metaloproteases do veneno possuem atividade proteolítica sobre o substrato azocaseína. Ao analisar os dados obtidos com as três concentrações de LALP3/SUMO utilizadas foi possível verificar o aumento gradual dos valores de absorbância conforme o aumento da concentração da enzima em relação ao substrato. Contudo, os valores obtidos para as amostras onde foi utilizado o inibidor 1,10-fenantrolina e a LALP3/SUMO foram semelhantes aos valores observados nas amostras onde foi utilizada apenas a proteína recombinante. Uma vez que a amostra utilizada para o experimento não apresentava alto grau de pureza, é possível que contaminantes como proteases bacterianas foram responsáveis pela proteólise da azocaseína. Ainda, por se tratar de um ensaio piloto, a confirmação dos dados obtidos deve ser realizada através de ensaios utilizando um total de 6 amostras por grupo para possibilitar a realização de dados estatísticos significativos.

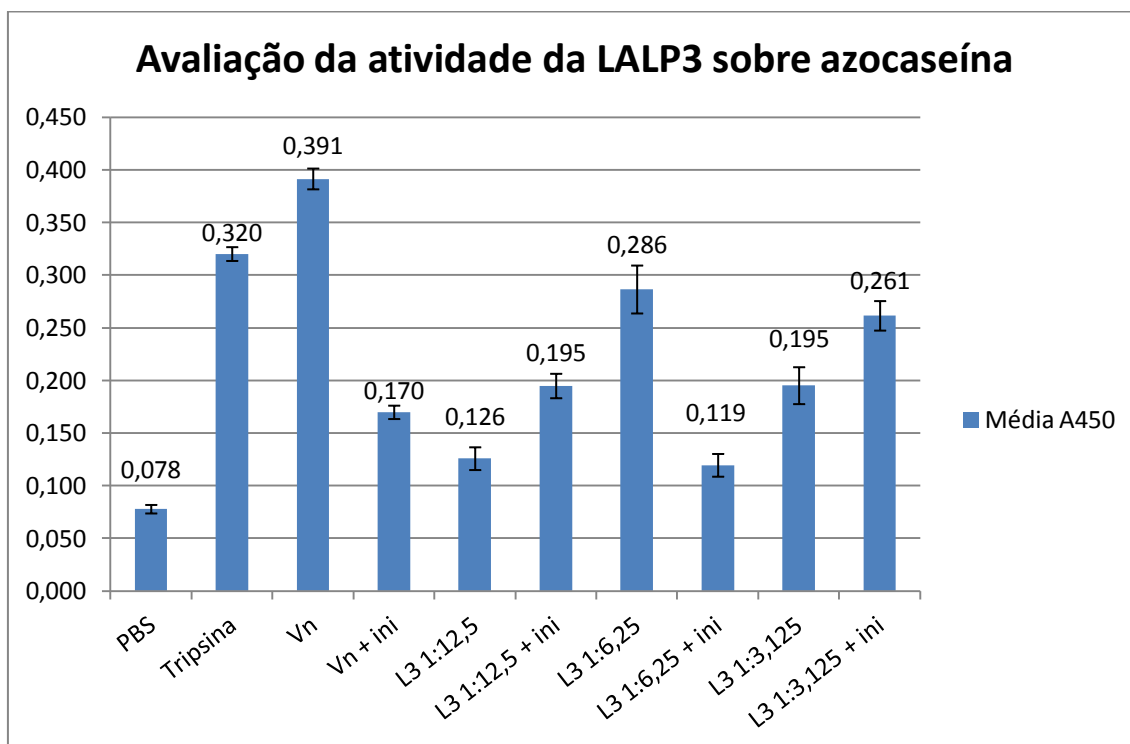


FIGURA 35 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA LALP3/SUMO EM DIFERENTES RAZÕES DE ENZIMA:SUBSTRATO. A azocaseína foi incubada com a proteína recombinante sob diferentes condições. Como controle negativo foi utilizado PBS e como controle de reação foi utilizada Tripsina. Como controle positivo foi utilizado o veneno total de *L. intermedia* (Vn), o qual apresentou atividade metaloproteásica sobre o substrato, inibida por 1,10-fenantrolina (Vn+ini). Os grupos teste utilizando a LALP3 não apresentaram atividade sobre a azocaseína. A avaliação dos grupos controle e grupos teste foi realizada em triplicatas.

5.13 Expressão da LALP3/SUMO em *E. coli* BL21 STAR (DE3) One Shot em larga escala a 37°C

Tendo em vista que os testes de atividade não demonstraram ação proteolítica da proteína recombinante obtida através da expressão em SHuffle T7 Express LysY (New England Biolabs) a 30°C por 4 horas, foi realizada a expressão em condições semelhantes utilizando a cepa BL21 STAR (DE3) One Shot (Invitrogen), utilizando o mesmo tempo de expressão (4h) e o mesmo meio de cultura (Tryptona-Fosfato), contudo, a expressão se deu a 37°C utilizando 0,05mM de IPTG. Esta expressão foi realizada visando a obtenção de grande parte da proteína recombinante na condição insolúvel para a posterior realização de uma purificação desnaturante.

A análise da expressão da LALP3 madura fusionada à proteína SUMO por SDS-PAGE 12,5% sob condições redutoras revelou que após 4 horas de expressão (T4) é possível observar uma banda com massa de aproximadamente 36kDa de grande intensidade se comparada com a banda observada na fração correspondente ao início da expressão, antes da adição do indutor. Ainda, ao observar a fração correspondente ao sobrenadante, é possível visualizar uma banda com massa de aproximadamente 36kDa com intensidade semelhante à da mesma banda visualizada na amostra em T0, indicando que a proteína recombinante não foi obtida ou apenas uma fração foi obtida na condição solúvel. Também foi possível observar a mesma banda na altura de aproximadamente 36kDa na fração correspondente ao precipitado com grande intensidade se comparada a banda obtida na fração correspondente ao início da expressão (T0), sugerindo que a maior parte da LALP3 madura fusionada à proteína SUMO foi expressa na condição insolúvel (Figura 36).

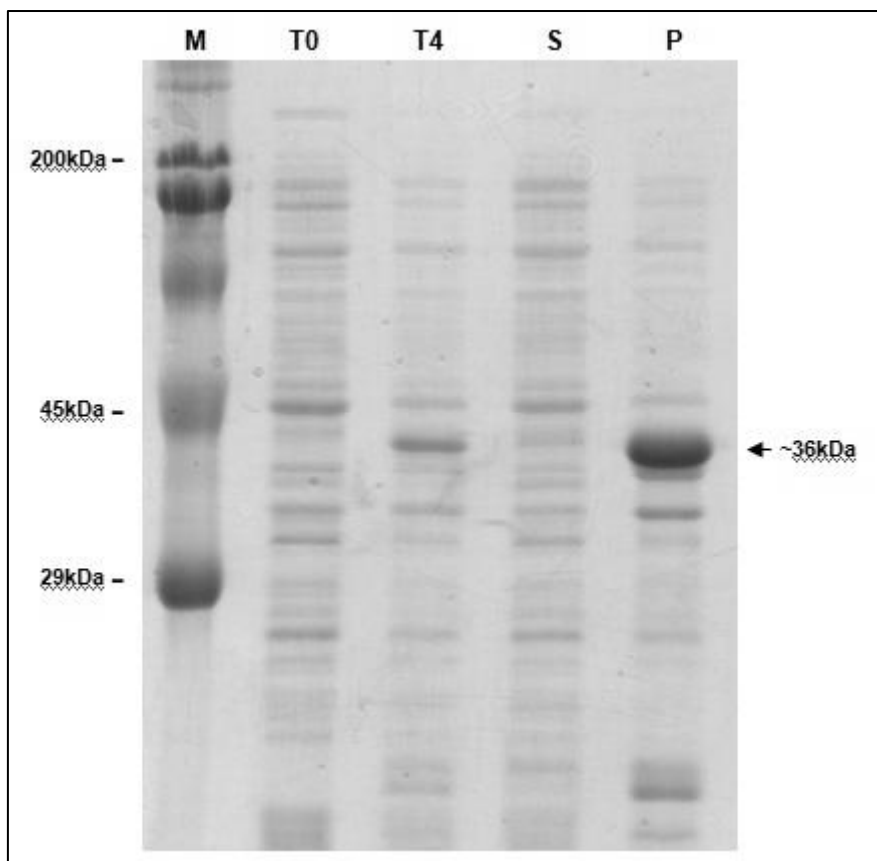


FIGURA 36 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DA EXPRESSÃO DA LALP3/SUMO EM MEIO TRIPTONA-FOSFATO A 37°C UTILIZANDO A CEPA BL21 STAR (DE3) ONE SHOT. Expressão realizada utilizando 0,05mM de IPTG a 37°C por 4 horas. As setas representam as bandas na altura de aproximadamente 36kDa referentes a LALP3 madura fusionada à proteína SUMO. A marcação “T0” representa o início da indução e “T4” indica o tempo em horas ao término da expressão. A amostra relativa ao sobrenadante está representada em “S”, sendo que ao comparar a banda obtida com a banda de “T0” observa-se que há pouca diferença de intensidade, indicando que a proteína recombinante não foi obtida ou apenas uma fração da mesma foi obtida em condição solúvel. Em “P” está representada a amostra referente ao precipitado obtido após a lise das culturas bacterianas, onde é possível observar a presença de uma banda indicando que a maior massa da proteína recombinante foi expressa na condição insolúvel.

5.14 Purificação da LALP3/SUMO por cromatografia de afinidade com resina de Ni-NTA agarose em condições desnaturantes.

Foi realizada a purificação da proteína recombinante obtida após a expressão em BL21 STAR (DE3) One Shot (Invitrogen) por cromatografia de afinidade utilizando resina composta por *beads* de Ni-NTA Agarose (QIAGEN). Brevemente, a amostra foi incubada com a resina de Ni-NTA Agarose previamente equilibrada com tampão de ligação desnaturante contendo ureia 8M e 10mM de imidazol. Após diversas lavagens com tampão de lavagem desnaturante de maior estringência contendo ureia 8M e 20mM de imidazol,

procedeu-se com a eluição da proteína recombinante com o uso do tampão de eluição desnaturante contendo ureia 8M e 250mM de imidazol.

Após a eluição da LALP3 madura fusionada à proteína SUMO, foram realizadas diálises contra tampão PBS e então seguiu-se como um ensaio de dosagem de proteínas pelo método de Bradford descrito no item 4.23 em Material e Métodos.

Foi observado que a concentração da proteína recombinante expressa nas condições citadas era de 0,53mg/mL em 8mL de solução após a eluição e diálises. Desta forma, em dois litros de cultura bacteriana foi possível obter aproximadamente 4mg da proteína recombinante, contudo, após as diálises a concentração da amostra era de 0,1mg/mL em 4mL de solução. Desta forma, foi realizada a concentração da proteína recombinante em concentrador SpeedVac Concentrator 5301(Eppendorf) até a proteína atingir 0,25mg/mL. A análise da pureza do produto eluído foi realizada através de um SDS-PAGE 12,5% sob condições redutoras, onde foi possível observar apenas uma banda com massa molecular aproximada de 18kDa referente à proteína SUMO livre da LALP3, sendo que a banda esperada com massa molecular de aproximadamente 36kDa (LALP3 fusionada à proteína SUMO) e a banda de 24kDa (LALP3 livre da proteína SUMO) não foram observadas na amostra após a eluição, contudo, estas bandas estão presentes na amostra referente à primeira lavagem com tampão de lavagem desnaturante. Isto indica que durante as lavagens a proteína recombinante foi perdida e outras condições de purificação desnaturante devem ser testadas (Figura 37).

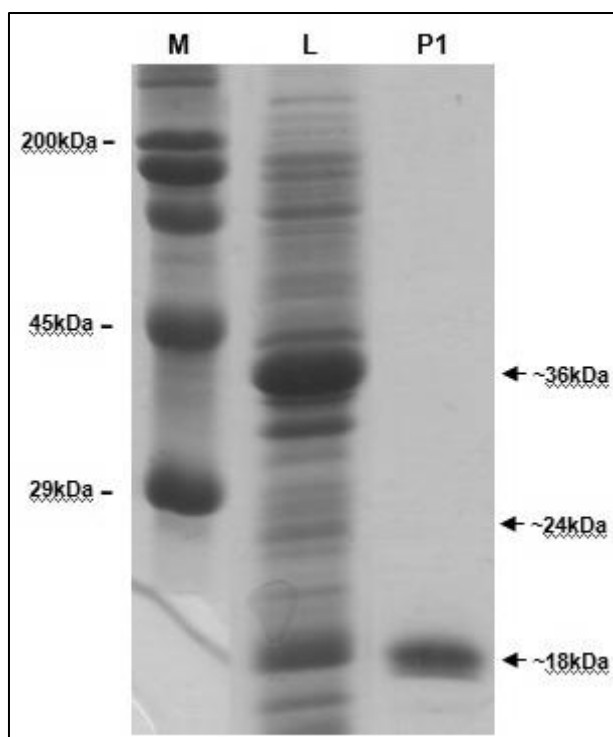


FIGURA 37 – ANÁLISE POR SDS/PAGE 12,5% SOB CONDIÇÕES REDUTORAS DA PURIFICAÇÃO DESNATURANTE DA LALP3/SUMO APÓS EXPRESSÃO EM BL21 STAR (DE3) ONE SHOT. Purificação realizada após expressão utilizando 0,05mM de IPTG a 37°C por 4 horas. Em “P1” está representada a amostra obtida após a eluição e diálises. Em “L” está representada a amostra referente a primeira lavagem com tampão de lavagem desnaturante. Após a purificação é possível observar apenas a banda referente à proteína SUMO livre da LALP3 em 18kDa em “P1”, sendo que as bandas esperadas em aproximadamente 36kDa (LALP3 fusionada à proteína SUMO) e 24kDa (LALP3 livre da proteína SUMO) não são visualizadas em “P1”, mas podem ser visualizadas na amostra representada em “L”.

6.0 DISCUSSÃO

No veneno de *L. intermedia* foram descritas duas enzimas nativas com atividade de metaloprotease (FEITOSA *et al.*, 1998). Por meio da biblioteca da glândula produtora de venenos de *L. intermedia* a primeira metaloprotease do tipo astacina presente em venenos animais foi clonada, expressa e denominada LALP1. Análises de atividade desta enzima demonstraram a atividade gelatinolítica, fibrinogenolítica e fibronectinolítica da mesma (DA SILVEIRA *et al.*, 2007a). Além da LALP1, duas novas isoformas da enzima foram caracterizadas e denominadas LALP2 e LALP3, porém, apenas o precursor de ambas isoformas foi clonado sem que houvesse a expressão heteróloga de qualquer uma delas (TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010). Desta maneira este trabalho foi desenvolvido visando a obtenção da toxina recombinante LALP3 madura e avaliação de sua atividade.

Ao realizar a análise da estrutura tridimensional predita da LALP3 utilizando como molde o cristal da astacina de *A. astacus* (código PDB:1AST), foi verificado que as estruturas da LALP3 é semelhante a estrutura da astacina, assumindo uma conformação “riniforme” como demonstrado por Gomis-Ruth *et al.* (1993). Uma vez que o sítio ativo das metaloproteases da família das astacinas é conservado (BODE *et al.*, 1993; GOMIS-RUTH, 2003) observou-se que a fenda catalítica da LALP3 possivelmente assume uma conformação tridimensional característica permitindo a interação com o íon zinco, metal determinante para a atividade das astacinas (Figuras 10 e 11).

Buscando a obtenção de uma nova isoforma de metaloprotease do tipo astacina presente no veneno de *L. intermedia*, foi utilizado o cDNA referente à LALP3 madura, de modo que a análise da estrutura básica das astacinas foi necessária para a determinação da melhor estratégia para a clonagem do cDNA referente à proteína madura no vetor de expressão apropriado.

Considerando os aspectos estruturais da astacina de *A. astacus* e da predição tridimensional da LALP3 por meio de ferramentas de bioinformática, acredita-se que no caso de expressão heteróloga da proteína recombinante, a região N-terminal do peptídeo deveria ser mantido livre de etiquetas como uma cauda de 6 histidinas utilizada na purificação de enzimas. Ainda, levando em conta que as LALPs possuem peptídeo sinal e pró-peptídeo (DA SILVEIRA *et*

al., 2007a; TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010) e 3 dos aminoácidos que contribuem para a ligação do íon zinco ao sítio catalítico da enzima são histidinas, postula-se que uma etiqueta de 6 histidinas na posição N-terminal à proteína poderia desestabilizar a ligação com o zinco, podendo assim afetar a atividade da enzima. Suportando estas hipóteses, sabe-se que outras metaloproteases do tipo astacina recombinantes já expressas em organismos procarióticos possuem a etiqueta de histidina na posição C-terminal à proteína (QUESADA *et al.*, 2004; REYDA *et al.*, 1999; JING *et al.*, 2010; DE MAERE *et al.*, 2005). Com base nessas informações, optou-se por clonar e expressar a LALP3 madura inicialmente em vetor de expressão pET20b+ o qual possibilita a inserção de uma etiqueta de 6 histidinas fusionada à região C-terminal da proteína recombinante.

Uma vez obtida a sequência da LALP3 madura através da clonagem em vetor pGEM-T e confirmação da sequência por meio de alinhamento com base de dados, primeiramente obtou-se pela subclonagem da LALP3 madura em vetor de expressão pET20b+ visando a expressão da proteína recombinante. Os testes realizados com a cepa de *E. coli* SHuffle T7 Express LysY (Figuras 16, 17 e 18) demonstraram que a expressão da proteína recombinante foi bem sucedida. Contudo, ao analisar as amostras referentes ao sobrenadante obtido após a lise da culturas bacterianas, foi possível identificar que a proteína foi expressa na condição insolúvel agregada em corpos de inclusão.

Ao analisar dados obtidos por outros autores em relação à expressão heteróloga de metaloproteases do tipo astacina em organismos procariotos, foi constatado que após a expressão destas proteínas é comum observar agregados das mesmas em corpos de inclusão e o uso de técnicas de *refolding* (técnica de redobramento *in vitro*) foi necessário para a obtenção das proteínas solúveis e ativas. Da Silveira *et al.* (2007c), ao realizar a expressão da LALP1 fusionada a uma etiqueta de 6 histidinas na posição N-terminal da proteína recombinante em cepa de *E. coli* BL21(DE3) pLysS utilizando o meio Luria-Bertani (LB), observou que a proteína se encontrava insolúvel e foi necessário induzir o redobramento das proteínas obtidas em corpos de inclusão por meio da técnica de *refolding* (técnica de redobramento *in vitro*), buscando a conformação correta da proteína e consequente solubilidade da mesma. De forma semelhante, Reyda *et al.* (1999) expressaram a astacina de *A. astacus*

em cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS em meio LB e verificaram que após a expressão a proteína se encontrava insolúvel presente em corpos de inclusão, sendo que foi necessária a aplicação de técnicas de redobramento *in vitro* para obter a proteína solúvel. Quesada *et al.* (2004), em um estudo envolvendo a ovastacina humana recombinante, realizaram a expressão da proteína em *E. coli* BL21(DE3) pLysS em meio LB, e da mesma forma que os autores mencionados anteriormente, obtiveram a proteína em corpos de inclusão, sendo necessário o *refolding* para obter a mesma em condição solúvel. A partir destes dados, observa-se que técnicas de redobramento *in vitro* são aplicadas para a obtenção da proteína recombinante na condição solúvel e com atividade.

Sabe-se que altas taxas de expressão de proteínas recombinantes em sistemas procarióticos geralmente resultam na formação de corpos de inclusão (FISCHER *et al.*, 1992). Expressões visando a obtenção destes agregados proteicos insolúveis têm como vantagens: alto rendimento de proteína obtida, proteção da proteína recombinante contra degradação proteolítica, facilidade de separação das proteínas insolúveis e solúveis após a lise das células (MISAWA e KUMAGAI, 1999; LI *et al.*, 2004). No entanto, a conversão das proteínas do estado insolúvel para solúvel e com atividade biológica geralmente requer a aplicação de técnicas de *refolding* (CLARK, 1998). Tais técnicas compreendem a solubilização dos corpos de inclusão por meio de agentes desnaturantes, os quais são removidos posteriormente e o redobramento é realizado na presença de pares *redox* ou de outros agentes que auxiliam o dobramento correto das proteínas. Dentre as técnicas aplicadas é comum observar o uso do redobramento por troca de tampão, porém, proteínas dobradas incorretamente podem permanecer presentes nas amostras, sendo obtida uma solução com proteínas em diferentes conformações, sendo que apenas algumas podem estar ativas (WEST *et al.*, 1998).

Uma das alternativas para a obtenção de proteínas recombinantes em condição solúvel sem o uso de *refolding* envolve a utilização de proteínas de fusão que atuam como etiquetas de solubilidade, as quais quando posicionadas na região N-terminal da proteína recombinante alvo protegem a

mesma da degradação por proteases bacterianas (MARTINEZ *et al.*, 1995), podem aumentar sua expressão (ARECHAGA *et al.*, 2003) e geralmente são expressas na condição solúvel e dobradas de maneira correta (MALAKHOV *et al.*, 2004; SATAKARNI e CURTIS, 2011; WANG *et al.*, 2012a).

Considerando os resultados obtidos a partir das expressões da LALP3 utilizando o vetor pET20b+, onde não foi possível a obtenção da proteína recombinante na condição solúvel, foi realizada a clonagem e expressão da LALP3 madura no vetor de expressão Champion pET-SUMO, onde a proteína SUMO é fusionada à região N-terminal da proteína recombinante alvo. A proteína SUMO (*Small Ubiquitin-Related Modifier*) tem sido utilizada com sucesso como uma etiqueta de solubilidade, onde proteínas que geralmente são obtidas na condição insolúvel em corpos de inclusão, após a fusão com a proteína SUMO, são obtidas na condição solúvel no sobrenadante após a expressão e lise das células (SATAKARNI e CURTIS, 2011; WANG *et al.*, 2012a; BUTT *et al.*, 2005; PRAKASH *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2012).

Testes de expressão realizados com as cepas de *E. coli* SHuffle T7 Express LysY (Figura 20), BL21 (DE3) pLysS (Figura 24) e BL21 STAR (DE3) One Shot (Figura 25) demonstraram que a proteína recombinante foi obtida na condição solúvel. Contudo, imunoensaaios de *Western Blotting* evidenciaram o possível truncamento durante a expressão da LALP3 (Figuras 21, 22, 23 e 26).

O truncamento de proteínas durante a expressão pode ser ocasionado pelo sistema de códons utilizado por organismos procarióticos, o que por sua vez afeta o rendimento da expressão. Códons presentes nas sequências de DNA de genes eucarióticos são raramente utilizados por bactérias, ou seja, a disposição de RNAs transportadores que reconhecem estes códons é pequena nestes organismos, de modo que durante a expressão da proteína recombinante pode haver a incorporação de aminoácidos errados na sequência da proteína ou causar o truncamento da mesma (GUSTAFSSON *et al.*, 2004). Em alguns casos é empregada a otimização de códons para diminuir o truncamento durante a expressão e aumentar o rendimento de proteínas recombinantes. Proteínas como a cistatina-C e kalistatina humanas foram expressas em cepas de *E. coli* com maior rendimento após possuir as sequências dos respectivos genes terem sido submetidas à otimização de códons (WANG *et al.*, 2012b; DAI *et al.*, 2013). É importante ressaltar que esta

otimização pode ser empregada no cDNA referente à LALP3 madura, se tornando uma alternativa para aumentar o rendimento e diminuir o truncamento da proteína recombinante.

Uma vez que os testes realizados com as cepas citadas anteriormente resultaram na obtenção da proteína recombinante na condição solúvel, e o rendimento foi similar após expressões nas três cepas utilizadas, optou-se pelo uso da cepa SHuffle T7 Express LysY para a expressão da LALP3/SUMO em larga escala, tendo em vista que esta cepa possui em seu genoma uma cópia do gene que codifica para a chaperona DsbC (*Disulfide Bond Isomerase*), a qual promove a formação de pontes dissulfeto no citosol e também atua como chaperona auxiliando no dobramento correto da proteína, e o citosol menos redutor devido à deleções de duas redutases (BESSETTE *et al.*, 1999; QIU *et al.*, 1998). Estudos envolvendo a utilização da cepa SHuffle demonstraram que tanto o citosol menos redutor quanto a presença da chaperona DsbC citosólica promovem o dobramento correto de proteínas. Foi realizada a expressão de três proteínas que dependem da formação de pontes dissulfeto para adquirir a conformação correta e apresentar atividade: luciferase (10 cisteínas), uroquinase (12 cisteínas) e vtPA (18 cisteínas). Ao analisar a atividade das proteínas recombinantes após a expressão em SHuffle na ausência da DsbC, foi verificado que a luciferase e a uroquinase se encontravam ativas, porém, a vtPA não possuiu atividade. Ao realizar os mesmos testes após a expressão utilizando a mesma cepa na presença da chaperona DsbC, foi observado que a uroquinase apresentou aumento na atividade e a vtPA se tornou ativa, demonstrando que tanto o citosol menos redutor, quanto a presença da chaperona DsbC citosólica auxiliam no dobramento correto de proteínas que dependem de pontes dissulfeto para assumir a conformação correta (LOBSTEIN *et al.*, 2012). Além disso, em outro trabalho foi realizada a expressão de domínios RAMP2 e CLR do receptor para o hormônio adrenomedulina, os quais apresentam cisteínas que formam pontes dissulfeto importantes para a integridade estrutural do receptor. Os domínios foram fusionados à proteína DsbC e após a expressão e purificação das proteínas recombinantes foi verificado que a chaperona possibilitou a formação de pontes dissulfeto e resultou na obtenção do receptor na condição solúvel e com a conformação correta (HILL e PIOSZAK, 2012). Estes dados reforçam a

hipótese de que a LALP3 madura obtida após a expressão em cepa SHuffle T7 Express LysY pode assumir a conformação correta e apresentar atividade enzimática.

Após a expressão da proteína utilizando 1mM de IPTG, foi observado que a LALP3 madura fusionada à SUMO estava presente na fração referente ao sobrenadante obtido após a lise da cultura bacteriana e posterior centrifugação, demonstrando que a proteína recombinante foi obtida na condição solúvel (Figura 28). Contudo, após a purificação da proteína por cromatografia de afinidade utilizando resina de Ni-NTA Agarose, além de contaminantes, foram observadas bandas referentes à LALP3 madura livre da proteína SUMO (aproximadamente 24kDa) e à proteína SUMO não fusionada à proteína recombinante (aproximadamente 18kDa) (Figura 30). Este evento pode ser decorrente da clivagem da proteína SUMO por uma cisteíno-protease bacteriana.

A partir desta hipótese, foi realizada a expressão da LALP3/SUMO em cepa de *E. coli* BL21 STAR (DE3) One Shot, visto que uma das características desta cepa é apresentar maior rendimento na expressão de proteínas recombinantes. Após a expressão as amostras foram incubadas com inibidor de cisteíno-protease iodoacetamida. Este inibidor é específico para cisteíno-proteases, de modo que o seu uso foi empregado visando a inibição da clivagem da LALP3 madura da proteína de fusão SUMO, como verificado após a purificação citada anteriormente utilizando a cepa SHuffle T7 Express LysY. Contudo, a análise das amostras e imunoenaios de *Western Blotting* revelaram que a LALP3 madura estava presente na amostra livre da proteína SUMO após a purificação, reforçando a hipótese de auto-clivagem (Figuras 31 e 32). Tendo em vista que a utilização do inibidor iodoacetamida não foi capaz de inibir a clivagem da LALP3 madura da proteína SUMO, sugere-se que este evento pode então estar ocorrendo durante a expressão da proteína recombinante ou pode ser decorrente da ação de outras proteases bacterianas.

Uma vez que metaloproteases do tipo astacinas são endopeptidases (BOND e BEYNON, 1995) estas podem apresentar auto-clivagem, como observado no processo de ativação destas enzimas em que o pró-peptídeo é clivado pelo próprio sítio catalítico da astacina (GUEVARA *et al.*, 2010), de

modo que a possível clivagem da proteína SUMO separando-a da LALP3 madura poderia ser resultado da atividade parcial ou total da enzima.

Sob as condições de expressão avaliadas, pode-se afirmar que as expressões da LALP3 madura fusionada à proteína SUMO nas cepas de *E. coli* BL21 Star (DE3) OneShot e SHuffle T7 Express LysY resultaram na proteína recombinante em condição solúvel sem a utilização de técnicas de *refolding*. Ainda, purificações por afinidade utilizando resina de Ni-NTA Agarose resultaram na obtenção da proteína recombinante LALP3 madura nas formas livre e associada à proteína de fusão SUMO, indicando a possível ocorrência da clivagem do produto inicial obtido após a expressão. Mesmo na forma livre, uma fração da LALP3 madura se apresentou na condição solúvel, de modo que a utilização de outros passos de purificação podem ser necessários para a obtenção de amostras contendo a proteína recombinante livre de contaminantes (SUMO ou proteínas bacterianas). Estudos envolvendo a expressão heteróloga de outras metaloproteases do tipo astacina em sistema procariótico resultaram na obtenção da proteína com alto grau de pureza, livre de contaminantes. De maneira semelhante à empregada na purificação da LALP3 madura, da Silva *et al.* (2006) realizaram a purificação da BP10 de ouriço-do-mar por meio da utilização de cromatografia de afinidade com resina de Ni-NTA Agarose. Além disso, Quesada *et al.* (2004) utilizaram outra metodologia para purificar a ovastacina de humanos, onde a proteína recombinante foi obtida livre de contaminantes através de cromatografia de exclusão por tamanho. Em uma terceira abordagem, Reyda *et al.* (1990) purificaram a astacina de *Astacus astacus* por cromatografia de afinidade utilizando o peptídeo hidroxamato inibidor que se liga ao sítio catalítico de metaloproteases do tipo astacina. Desta maneira, técnicas de purificação semelhantes podem ser aplicadas para a obtenção da LALP3 madura pura.

Uma vez que ambas as expressões em larga escala resultaram na obtenção LALP3 separada da proteína de fusão SUMO, para os testes de atividade optou-se pelo uso da amostra purificada proveniente da expressão em SHuffle T7 Express LysY, devido às características da cepa mencionadas anteriormente. De acordo com da Silveira *et al.* (2007c) as metaloproteases do tipo astacina presentes no veneno de *L. intermedia* apresentam atividade proteolítica sobre moléculas de fibrinogênio, como demonstrado com a LALP1

recombinante, sendo então um substrato passível de proteólise pela LALP3. Em outro estudo, Feitosa *et al.* (1998) demonstraram que uma metaloprotease do veneno de *L. intermedia* possui atividade sobre moléculas de gelatina (colágeno desnaturado), de modo que a LALP3 poderia apresentar atividade sobre este substrato. Adicionalmente, a caseína foi demonstrada como sendo substrato para a astacina de *A. astacus* (BOND e BEYNON, 1995), de modo que a LALP3 também poderia apresentar atividade proteolítica sobre esta molécula. No entanto, foi observado que o teste de atividade proteolítica da LALP3 sobre o fibrinogênio (Figura 33), colágeno tipo I desnaturado (Figura 34 A e B) e azocaseína (Figura 35) demonstraram que a proteína recombinante não exibiu atividade sobre os substratos nas condições avaliadas.

Uma vez que a LALP3 madura não exibiu tal atividade, é possível que mesmo solúvel a enzima não tenha assumido a conformação ideal para apresentar atividade. Após uma tentativa de redobramento *in vitro* por troca de tampão buscando a obtenção da LALP3 madura dobrada corretamente, foi constatada a perda da proteína recombinante após a purificação. Desta forma, sugere-se que as condições de purificação utilizadas resultaram no desligamento da proteína recombinante da resina de Ni-NTA Agarose durante as lavagens, com consequente perda da amostra; ou que a proteína recombinante não foi capaz de ser renaturada apenas com diálise contra PBS, de forma a precipitar, tendo apenas a proteína SUMO renaturado e se apresentado na condição solúvel (Figura 37).

Visto que as astacinas expressas por outros autores utilizando sistemas de expressão em organismos procarióticos foram obtidas com o emprego da técnica de *refolding* (DA SILVEIRA *et al.*, 2007a; QUESADA *et al.*, 2004; REYDA *et al.*, 1999), outras possibilidades podem ser exploradas para a obtenção da LALP3 madura na condição solúvel. Além do redobramento *in vitro* realizado em condições mais elaboradas (com o uso de pares *redox*, por exemplo), o uso de outros sistemas de expressão podem ser alternativas ao uso de sistemas procarióticos. Sistemas eucarióticos utilizando leveduras como *Pichia pastoris* e células de inseto de *Spodoptera frugiperda* (SF9) demonstraram resultados promissores na obtenção de astacinas recombinantes em condição solúvel e ativa, uma vez que tais células possuem organelas para o processamento de proteínas, possibilitando, por exemplo, a

glicosilação das proteínas. Yokosawa *et al.* (2002) expressaram a ALSM-1, uma metaloprotease do tipo astacina de lula, utilizando o sistema de baculovírus para a infecção de células de *Spodoptera frugiperda* (SF9). O resultado obtido foi a proteína solúvel e com atividade catalítica. De maneira semelhante, de Maere *et al.* (2005) expressaram a MET-1, metaloprotease do tipo astacina do nematódeo *Ostertagia ostertagi*, utilizando o sistema de baculovírus para infectar células da linhagem SF9. Após a expressão da proteína fusionada a cauda de histidina na posição C-terminal, foi possível obter a proteína solúvel sem a necessidade da realização de *refolding*. Ainda, em um estudo recente, Becker-Pauly *et al.* (2009) expressaram e em sua forma solúvel as metaloproteases do tipo astacina de *Limulus polyphemus* – LAST e LAST-MAM – utilizando sistema de baculovírus para infectar células SF9.

Com base nestas informações, é possível especular que a expressão da LALP3 em sistemas eucarióticos poderia resultar na obtenção da proteína solúvel e com atividade. Contudo, a utilização do sistema de expressão procariótico possui vantagens como o tempo de crescimento da cultura, baixo custo, facilidade de manuseio e altos níveis de expressão da proteína recombinante de interesse, porém, a superexpressão da proteína recombinante agregada em corpos de inclusão e a ausência de organelas como retículo endoplasmático e complexo de Golgi para a realização de modificações pós-traducionais representa desvantagens em comparação com sistemas de expressão eucarióticos (BERNAUDAT *et al.*, 2011; SAHDEV *et al.*, 2008; JARVIS e FINN, 1995). Uma vez que estudos com *L. intermedia* têm possibilitado a obtenção de proteínas recombinantes com sucesso utilizando o sistema de expressão em procariotos (CHAIM *et al.*, 2006; DA SILVEIRA *et al.*, 2007a; DA SILVEIRA *et al.*, 2007b; DA SILVEIRA *et al.*, 2006; APPEL *et al.*, 2008; DA SILVEIRA *et al.*, 2007c; SADE *et al.*, 2012; DE GIUSEPPE *et al.*, 2011), optou-se por utilizar estratégias semelhantes para a expressão da LALP3 madura.

Tendo em vista que as expressões da proteína recombinante utilizando as cepas de *E. coli* BL21 STAR (DE3) OneShot e SHuffle T7 Express LysY resultaram na obtenção da proteína em condição solúvel, ainda utilizando o sistema de expressão procarioto sugere-se que ou um refinamento da purificação deve ser realizado para livrar a amostra de contaminantes, ou a

utilização de técnicas de redobramento *in vitro* mais elaboradas poderiam ser empregadas a fim de se proceder com a avaliação da atividade da LALP3 madura através de ensaios *in vitro* e *in vivo*. No entanto, é importante ressaltar que também é considerado como alternativa o uso modelos de expressão utilizando leveduras ou células de inseto para a expressão da LALP3 madura recombinante.

7.0 CONCLUSÃO

Durante o desenvolvimento deste trabalho foi possível realizar a clonagem da sequência da LALP3 madura e proceder com a expressão heteróloga da proteína recombinante em sistema de expressão procariótico utilizando diferentes cepas de *E. coli*. Nas condições avaliadas pode-se afirmar que após as expressões uma fração da proteína recombinante foi obtida na condição solúvel. Foram realizados testes de atividade da LALP3 madura sobre os substratos fibrinogênio, colágeno tipo I desnaturado e azocaseína, contudo, não foi possível constatar a atividade da enzima. Ainda, após a purificação da proteína por cromatografia de afinidade, foi possível observar a possível clivagem da proteína recombinante, liberando a proteína SUMO da LALP3 madura. Acredita-se que esta clivagem seja causada possivelmente por auto-catálise da LALP3 madura ou por atividade de proteases provenientes da cultura bacteriana. Mesmo a tentativa de *refolding* por troca de tampões não resultou em aumento de rendimento da proteína recombinante na condição solúvel, de modo que a avaliação e refinamento dos parâmetros de purificação para a utilização da LALP3 madura em testes de atividade enzimática, bem como a possível aplicação de técnicas de *refolding* mais elaboradas e uso de sistemas de expressão eucarióticos devem ser realizados a fim de obter a LALP3 madura em condição solúvel e na forma ativa.

8.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Como perspectivas futuras tem-se que a obtenção de isoformas recombinantes das metaloproteases do tipo astacina do veneno de aranhas da espécie *Loxosceles intermedia* podem gerar ferramentas de uso biotecnológico. Estas enzimas podem ser utilizadas em estudos envolvendo a remodelagem da matriz extracelular, como co-adjuvantes na administração de fármacos, como agentes trombolíticos e também no desenvolvimento de inibidores de metaloproteases do tipo astacina. Além disso, como componentes do veneno de aranhas-marrons, as isoformas de metaloproteases do tipo astacina recombinantes podem ser utilizadas em estudos para a elucidação dos mecanismos pelos quais estas enzimas operam em casos de loxoscelismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKDENIZ, S.; GREEN, J. A.; STOECKER, W. V.; GOMEZ, H. F.; KEKLIKCI, S. U. Diagnosis of loxoscelism in two Turkish patients confirmed with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and non-invasive tissue sampling. **Dermatol Online J**, 13 (2):11, 2007.

APPEL, M. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O. M.; PALUDO, K. S.; SILVA, D. T.; CHAVES, D. M.; DA SILVA, P. H.; MANGILI, O. C.; SENFF-RIBEIRO, A.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochim Biophys Acta**, 1780 (2):167-178, 2008.

APPEL, M. H.; DA SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Insights into brown spider and loxoscelism. **Invertebrate Survival Journal**, 2 152 - 158, 2005.

ARECHAGA, I.; MIROUX, B.; RUNSWICK, M. J.; WALKER, J. E. Over-expression of Escherichia coli F1F(o)-ATPase subunit a is inhibited by instability of the uncB gene transcript. **FEBS Lett**, 547 (1-3):97-100, 2003.

ARNOLD, K.; BORDOLI, L.; KOPP, J.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, 22 (2):195-201, 2006.

BALABAN, N. P.; RUDAKOVA, N. L.; SHARIPOVA, M. R. Structural and functional characteristics and properties of metzincins. **Biochemistry (Mosc)**, 77 (2):119-127, 2012.

BARBARO, K. C.; CARDOSO, J. L.; EICKSTEDT, V. R.; MOTA, I. Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon**, 30 (3):331-338, 1992.

BARBARO, K. C.; EICKSTEDT, V. R.; MOTA, I. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. **Toxicon**, 32 (1):113-120, 1994.

BARBARO, K. C.; FERREIRA, M. L.; CARDOSO, D. F.; EICKSTEDT, V. R.; MOTA, I. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders. **Braz J Med Biol Res**, 29 (11):1491-1497, 1996.

BARBARO, K. C.; KNYSACK, I.; MARTINS, R.; HOGAN, C.; WINKEL, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**, 45 (4):489-499, 2005.

BECKER-PAULY, C.; BARRE, O.; SCHILLING, O.; AUF DEM KELLER, U.; OHLER, A.; BRODER, C.; SCHUTTE, A.; KAPPELHOFF, R.; STOCKER, W.; OVERALL, C. M. Proteomic analyses reveal an acidic prime side specificity for the astacin metalloprotease family reflected by physiological substrates. **Mol Cell Proteomics**, 10 (9):M111 009233, 2011.

BECKER-PAULY, C.; BRUNS, B. C.; DAMM, O.; SCHUTTE, A.; HAMMOUTI, K.; BURMESTER, T.; STOCKER, W. News from an ancient world: two novel astacin metalloproteases from the horseshoe crab. **J Mol Biol**, 385 (1):236-248, 2009.

BECKMANN, G.; BORK, P. An adhesive domain detected in functionally diverse receptors. **Trends Biochem Sci**, 18 (2):40-41, 1993.

BERNAUDAT, F.; FRELET-BARRAND, A.; POCHON, N.; DEMENTIN, S.; HIVIN, P.; BOUTIGNY, S.; RIOUX, J. B.; SALVI, D.; SEIGNEURIN-BERNY, D.; RICHAUD, P.; JOYARD, J.; PIGNOL, D.; SABATY, M.; DESNOS, T.; PEBAY-PEYROULA, E.; DARROUZET, E.; VERNET, T.; ROLLAND, N. Heterologous expression of membrane proteins: choosing the appropriate host. **PLoS One**, 6 (12):e29191, 2011.

BERTANI, R.; FUKUSHIMA, C. S.; NAGAHAMA, R. H. *Loxosceles chapadensis* (Araneae: Sicariidae): a new recluse spider species of the gaucho group from Brazil. **Journal of Arachnology**, 38 (2):364-367, 2010.

BESSETTE, P. H.; ASLUND, F.; BECKWITH, J.; GEORGIU, G. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 96 (24):13703-13708, 1999.

BINFORD, G. J.; CALLAHAN, M. S.; BODNER, M. R.; RYNERSON, M. R.; NUNEZ, P. B.; ELLISON, C. E.; DUNCAN, R. P. Phylogenetic relationships of *Loxosceles* and *Sicarius* spiders are consistent with Western Gondwanan vicariance. **Mol Phylogenet Evol**, 49 (2):538-553, 2008.

BODE, W.; GOMIS-RUTH, F. X.; HUBER, R.; ZWILLING, R.; STOCKER, W. Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases. **Nature**, 358 (6382):164-167, 1992.

BODE, W.; GOMIS-RUTH, F. X.; STOCKLER, W. Astacins, serralyins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. **FEBS Lett**, 331 (1-2):134-140, 1993.

BOND, J. S.; BEYNON, R. J. The astacin family of metalloendopeptidases. **Protein Sci**, 4 (7):1247-1261, 1995.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72 248-254, 1976.

BRAVO, M.; PURATIC, O.; BEHN, C.; FARDELLA, C.; CONTRERAS, A. [Hemolysis induced by *Loxosceles laeta* venom. In vitro experience]. **Rev Med Chil**, 121 (1):16-20, 1993.

BUCARETCHI, F.; DEUS REINALDO, C. R.; HYSLOP, S.; MADUREIRA, P. R.; DE CAPITANI, E. M.; VIEIRA, R. J. A clinico-epidemiological study of bites by spiders of the genus *Phoneutria*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 42 (1):17-21, 2000.

BUCARETCHI, F.; MELLO, S. M.; VIEIRA, R. J.; MAMONI, R. L.; BLOTTA, M. H.; ANTUNES, E.; HYSLOP, S. Systemic envenomation caused by the wandering spider *Phoneutria nigriventer*, with quantification of circulating venom. **Clin Toxicol (Phila)**, 46 (9):885-889, 2008.

BURKART, A. D.; XIONG, B.; BAIBAKOV, B.; JIMENEZ-MOVILLA, M.; DEAN, J. Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. **J Cell Biol**, 197 (1):37-44, 2012.

BUTT, T. R.; EDAVETTAL, S. C.; HALL, J. P.; MATTERN, M. R. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. **Protein Expr Purif**, 43 (1):1-9, 2005.

CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V. P.; SADE, Y. B.; BOIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L. H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; TAKAHASHI, H. K.; TOLEDO, M. S.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. **Biochim Biophys Acta**, 1811 (2):84-96, 2011.

CHAIM, O. M.; SADE, Y. B.; DA SILVEIRA, R. B.; TOMA, L.; KALAPOTHAKIS, E.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VON DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; SANCHES VEIGA, S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, 211 (1):64-77, 2006.

CHAIM, O. M.; TREVISAN-SILVA, D.; CHAVES-MOREIRA, D.; WILLE, A. C.; FERRER, V. P.; MATSUBARA, F. H.; MANGILI, O. C.; DA SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, L. H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes. **Toxins (Basel)**, 3 (3):309-344, 2011.

CHATZAKI, M.; HORTA, C. C.; ALMEIDA, M. O.; PEREIRA, N. B.; MENDES, T. M.; DIAS-LOPES, C.; GUIMARAES, G.; MORO, L.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; HORTA, M. C.; KALAPOTHAKIS, E. Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles similis* venom and neutralization capacity of its specific antivenom. **Toxicon**, 60 (1):21-30, 2012.

CHAVES-MOREIRA, D.; CHAIM, O. M.; SADE, Y. B.; PALUDO, K. S.; GREMSKI, L. H.; DONATTI, L.; DE MOURA, J.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DA SILVEIRA, R. B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. **J Cell Biochem**, 107 (4):655-666, 2009.

CHAVES-MOREIRA, D.; SOUZA, F. N.; FOGACA, R. T.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. The relationship between calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids in hemolysis induced by brown spider venom phospholipase-D toxin. **J Cell Biochem**, 112 (9):2529-2540, 2011.

CHEN, S. L.; LI, Z. S.; FANG, W. H. Theoretical investigation of astacin proteolysis. **J Inorg Biochem**, 111 70-79, 2012.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, 15 (3):532-534, 536-537, 1993.

CLARK, E. D. B. Refolding of recombinant proteins. **Curr Opin Biotechnol**, 9 (2):157-163, 1998.

COHEN, L.; KARBAT, I.; GILLES, N.; FROY, O.; CORZO, G.; ANGELOVICI, R.; GORDON, D.; GUREVITZ, M. Dissection of the functional surface of an anti-insect excitatory toxin illuminates a putative "hot spot" common to all scorpion beta-toxins affecting Na⁺ channels. **J Biol Chem**, 279 (9):8206-8211, 2004.

CORZO, G.; GILLES, N.; SATAKE, H.; VILLEGAS, E.; DAI, L.; NAKAJIMA, T.; HAUPT, J. Distinct primary structures of the major peptide toxins from the venom of the spider *Macrothele gigas* that bind to sites 3 and 4 in the sodium channel. **FEBS Lett**, 547 (1-3):43-50, 2003.

CRISTINA DE OLIVEIRA, K.; GONCALVES DE ANDRADE, R. M.; GIUSTI, A. L.; DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D. V. Sex-linked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. **Toxicon**, 37 (1):217-221, 1999.

DA SILVA, G. F.; REUILLE, R. L.; MING, L. J.; LIVINGSTON, B. T. Overexpression and mechanistic characterization of blastula protease 10, a metalloprotease involved in sea urchin embryogenesis and development. **J Biol Chem**, 281 (16):10737-10744, 2006.

DA SILVA, P. H.; DA SILVEIRA, R. B.; APPEL, M. H.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, 44 (7):693-709, 2004.

DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O. M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. **Toxicon**, 49 (6):758-768, 2007.

DA SILVEIRA, R. B.; DOS SANTOS FILHO, J. F.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VON DIETRICH, C. P. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. **Toxicon**, 40 (6):815-822, 2002.

DA SILVEIRA, R. B.; PIGOZZO, R. B.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.;

DREYFUSS, J. L.; TOMA, L.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. **Biochimie**, 88 (9):1241-1253, 2006.

DA SILVEIRA, R. B.; PIGOZZO, R. B.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; SILVA, D. T.; DREYFUSS, J. L.; TOMA, L.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. **Biochimie**, 89 (3):289-300, 2007.

DA SILVEIRA, R. B.; WILLE, A. C.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; SILVA, D. T.; FRANCO, C. R.; TOMA, L.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Biochem J**, 406 (2):355-363, 2007.

DAI, Z.; CHEN, Y.; QI, W.; HUANG, L.; ZHANG, Y.; ZHOU, T.; YANG, X.; GAO, G. Codon optimization increases human kallistatin expression in *Escherichia coli*. **Prep Biochem Biotechnol**, 43 (1):123-136, 2013.

DAVANLOO, P.; ROSENBERG, A. H.; DUNN, J. J.; STUDIER, F. W. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 81 (7):2035-2039, 1984.

DE ANDRADE, S. A.; MURAKAMI, M. T.; CAVALCANTE, D. P.; ARNI, R. K.; TAMBOURGI, D. V. Kinetic and mechanistic characterization of the Sphingomyelinases D from *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, 47 (4):380-386, 2006.

DE ANDRADE, S. A.; PEDROSA, M. F.; DE ANDRADE, R. M.; OLIVA, M. L.; VAN DEN BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. Conformational changes of *Loxosceles* venom sphingomyelinases monitored by circular dichroism. **Biochem Biophys Res Commun**, 327 (1):117-123, 2005.

DE CASTRO, C. S.; SILVESTRE, F. G.; ARAUJO, S. C.; GABRIEL DE, M. Y.; MANGILI, O. C.; CRUZ, I.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**, 44 (3):273-280, 2004.

DE GIUSEPPE, P. O.; ULLAH, A.; SILVA, D. T.; GREMSKI, L. H.; WILLE, A. C.; CHAVES MOREIRA, D.; RIBEIRO, A. S.; CHAIM, O. M.; MURAKAMI, M. T.;

VEIGA, S. S.; ARNI, R. K. Structure of a novel class II phospholipase D: catalytic cleft is modified by a disulphide bridge. **Biochem Biophys Res Commun**, 409 (4):622-627, 2011.

DE MAERE, V.; VERCAUTEREN, I.; GELDHOF, P.; GEVAERT, K.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOU, E. Molecular analysis of astacin-like metalloproteases of *Ostertagia ostertagi*. **Parasitology**, 130 (Pt 1):89-98, 2005.

DE OLIVEIRA CHRISTOFF, A.; DE OLIVEIRA, A.; CHAIM, O. M.; LUGARINI, D.; BASTOS PEREIRA, A. L.; PALUDO, K. S.; QUEIROZ TELLES, J. E.; BRACHT, A.; VEIGA, S. S.; ACCO, A. Effects of the venom and the dermonecrotic toxin LiRecDT1 of *Loxosceles intermedia* in the rat liver. **Toxicon**, 52 (6):695-704, 2008.

DE OLIVEIRA, K. C.; ANDRADE, R. M. G.; GIUSTI, A. L.; SILVA, W. D.; TAMBOURGI, D. V. Sexlinked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. **Toxicon**, 37 217 - 221, 1999.

DE OLIVEIRA, K. C.; GONCALVES DE ANDRADE, R. M.; PIAZZA, R. M.; FERREIRA, J. M., JR.; VAN DEN BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. **Toxicon**, 45 (4):421-429, 2005.

DOS SANTOS, L. D.; DIAS, N. B.; ROBERTO, J.; PINTO, A. S.; PALMA, M. S. Brown recluse spider venom: proteomic analysis and proposal of a putative mechanism of action. **Protein Pept Lett**, 16 (8):933-943, 2009.

DOS SANTOS, V. L.; FRANCO, C. R.; VIGGIANO, R. L.; DA SILVEIRA, R. B.; CANTAO, M. P.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W. Structural and ultrastructural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider). **Toxicon**, 38 (2):265-285, 2000.

DUMERMUTH, E.; STERCHI, E. E.; JIANG, W. P.; WOLZ, R. L.; BOND, J. S.; FLANNERY, A. V.; BEYNON, R. J. The astacin family of metalloendopeptidases. **J Biol Chem**, 266 (32):21381-21385, 1991.

ESCOUBAS, P.; DIOCHOT, S.; CORZO, G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. **Biochimie**, 82 (9-10):893-907, 2000.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; ELIAS, M. C.; GRANER, E.; MANGILI, O. C.; BRENTANI, R. R. Detection and characterization of

metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, 36 (7):1039-1051, 1998.

FERNANDES PEDROSA MDE, F.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO IDE, L.; GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M.; VAN DEN BERG, C. W.; RAMOS, C. R.; HO, P. L.; TAMBOURGI, D. V. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. **Biochem Biophys Res Commun**, 298 (5):638-645, 2002.

FISCHER, M. L.; VASCONCELLOS-NETO, J. Microhabitats occupied by *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* (Araneae: Sicariidae) in Curitiba, Parana, Brazil. **J Med Entomol**, 42 (5):756-765, 2005.

FISCHER, B.; SUMNER, I.; GOODENOUGH, P. Isolation and renaturation of bio-active proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. **Arzneimittelforschung**, 42 (12):1512-1515, 1992.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **Am J Med Sci**, 304 (4):261-267, 1992.

GAO, P.; GUO, R. W.; CHEN, J. F.; CHEN, Y.; WANG, H.; YU, Y.; HUANG, L. A meprin inhibitor suppresses atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice. **Atherosclerosis**, 207 (1):84-92, 2009.

GILBERT, S. F. Embriology, constructing the organism. **Ed. S. F. Gilbert and A. M. Raunio**, Sunderland, 1997.

GOMEZ, H. F.; KRYWKO, D. M.; STOECKER, W. V. A new assay for the detection of *Loxosceles* species (brown recluse) spider venom. **Ann Emerg Med**, 39 (5):469-474, 2002.

GOMIS-RUTH, F. X. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. **Mol Biotechnol**, 24 (2):157-202, 2003.

GOMIS-RUTH, F. X. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. **J Biol Chem**, 284 (23):15353-15357, 2009.

GOMIS-RUTH, F. X.; STOCKER, W.; HUBER, R.; ZWILLING, R.; BODE, W. Refined 1.8 Å X-ray crystal structure of astacin, a zinc-endopeptidase from the crayfish *Astacus astacus* L. Structure determination, refinement, molecular structure and comparison with thermolysin. **J Mol Biol**, 229 (4):945-968, 1993.

GOMIS-RUTH, F. X.; TRILLO-MUYO, S.; STOCKER, W. Functional and structural insights into astacin metallopeptidases. **Biol Chem**, 393 (10):1027-1041, 2012.

GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M.; BERTANI, R.; NAGAHAMA, R. H.; BARBOSA, M. F. *Loxosceles niedeguidonae* (Araneae, Sicariidae) a new species of brown spider from Brazilian semi-arid region. **Zookeys**, (175):27-36, 2012.

GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M.; TAMBOURGI, D. V. First record on *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849) (Araneae, Sicariidae) in the West Zone of Sao Paulo City, Sao Paulo, Brazil, and considerations regarding its geographic distribution. **Rev Soc Bras Med Trop**, 36 (3):425-426, 2003.

GREMSKI, L. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O. M.; PROBST, C. M.; FERRER, V. P.; NOWATZKI, J.; WEINSCHUTZ, H. C.; MADEIRA, H. M.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Mol Biosyst**, 6 (12):2403-2416, 2010.

GUEVARA, T.; YIALLOUROS, I.; KAPPELHOFF, R.; BISSDORF, S.; STOCKER, W.; GOMIS-RUTH, F. X. Proenzyme structure and activation of astacin metallopeptidase. **J Biol Chem**, 285 (18):13958-13965, 2010.

GUILHERME, P.; FERNANDES, I.; BARBARO, K. C. Neutralization of dermonecrotic and lethal activities and differences among 32-35 kDa toxins of medically important *Loxosceles* spider venoms in Brazil revealed by monoclonal antibodies. **Toxicon**, 39 (9):1333-1342, 2001.

GUSTAFSSON, C.; GOVINDARAJAN, S.; MINSHULL, J. Codon bias and heterologous protein expression. **Trends Biotechnol**, 22 (7):346-353, 2004.

HILL, H. E.; PIOSZAK, A. A. Bacterial expression and purification of a heterodimeric adrenomedullin receptor extracellular domain complex using DsbC-assisted disulfide shuffling. **Protein Expr Purif**, 88 (1):107-113, 2012.

HOGAN, C. J.; BARBARO, K. C.; WINKEL, K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. **Ann Emerg Med**, 44 (6):608-624, 2004.

HOOPER, N. M. Families of zinc metalloproteases. **FEBS Lett**, 354 (1):1-6, 1994.

HOPKINS, D. R.; KELES, S.; GREENSPAN, D. S. The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases. **Matrix Biol**, 26 (7):508-523, 2007.

ISBISTER, G. K. Data collection in clinical toxicology: debunking myths and developing diagnostic algorithms. **J Toxicol Clin Toxicol**, 40 (3):231-237, 2002.

ISBISTER, G. K.; FAN, H. W. Spider bite. **Lancet**, 378 (9808):2039-2047, 2011.

ISBISTER, G. K.; GRAUDINS, A.; WHITE, J.; WARRELL, D. Antivenom treatment in arachnidism. **J Toxicol Clin Toxicol**, 41 (3):291-300, 2003.

ISBISTER, G. K.; WHITE, J. Clinical consequences of spider bites: recent advances in our understanding. **Toxicon**, 43 (5):477-492, 2004.

ISBISTER, G. K.; WHITE, J.; CURRIE, B. J.; BUSH, S. P.; VETTER, R. S.; WARRELL, D. A. Spider bites: addressing mythology and poor evidence. **Am J Trop Med Hyg**, 72 (4):361-364; author reply 364-367, 2005.

JARVIS, D. L.; FINN, E. E. Biochemical analysis of the N-glycosylation pathway in baculovirus-infected lepidopteran insect cells. **Virology**, 212 (2):500-511, 1995.

JEFFERSON, T.; CAUSEVIC, M.; AUF DEM KELLER, U.; SCHILLING, O.; ISBERT, S.; GEYER, R.; MAIER, W.; TSCHICKARDT, S.; JUMPERTZ, T.; WEGGEN, S.; BOND, J. S.; OVERALL, C. M.; PIETRZIK, C. U.; BECKER-PAULY, C. Metalloprotease meprin beta generates nontoxic N-terminal amyloid precursor protein fragments in vivo. **J Biol Chem**, 286 (31):27741-27750, 2011.

JING, Y.; TOUBARRO, D.; HAO, Y.; SIMOES, N. Cloning, characterisation and heterologous expression of an astacin metalloprotease, Sc-AST, from the entomoparasitic nematode *Steinernema carpocapsae*. **Mol Biochem Parasitol**, 174 (2):101-108, 2010.

KALAPOTHAKIS, E.; CHATZAKI, M.; GONCALVES-DORNELAS, H.; DE CASTRO, C. S.; SILVESTRE, F. G.; LABORNE, F. V.; DE MOURA, J. F.;

VEIGA, S. S.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; GRANIER, C.; BARBARO, K. C. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitao) venom. **Toxicon**, 50 (7):938-946, 2007.

KESSLER, E.; TAKAHARA, K.; BINIAMINOV, L.; BRUSEL, M.; GREENSPAN, D. S. Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. **Science**, 271 (5247):360-362, 1996.

KIEFER, F.; ARNOLD, K.; KUNZLI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. **Nucleic Acids Res**, 37 (Database issue):D387-392, 2009.

KOHLER, D.; KRUSE, M.; STOCKER, W.; STERCHI, E. E. Heterologously overexpressed, affinity-purified human meprin alpha is functionally active and cleaves components of the basement membrane in vitro. **FEBS Lett**, 465 (1):2-7, 2000.

KUSMA, J.; CHAIM, O. M.; WILLE, A. C.; FERRER, V. P.; SADE, Y. B.; DONATTI, L.; GREMSKI, W.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie**, 90 (11-12):1722-1736, 2008.

LEE, D. G.; JEON, J. H.; JANG, M. K.; KIM, N. Y.; LEE, J. H.; KIM, S. J.; KIM, G. D.; LEE, S. H. Screening and characterization of a novel fibrinolytic metalloprotease from a metagenomic library. **Biotechnol Lett**, 29 (3):465-472, 2007.

LEPAGE, T.; GHIGLIONE, C.; GACHE, C. Spatial and temporal expression pattern during sea urchin embryogenesis of a gene coding for a protease homologous to the human protein BMP-1 and to the product of the *Drosophila* dorsal-ventral patterning gene tolloid. **Development**, 114 (1):147-163, 1992.

LEROY, A.; VANZO, N. F.; SOUSA, S.; DREYFUS, M.; CARPOUSIS, A. J. Function in *Escherichia coli* of the non-catalytic part of RNase E: role in the degradation of ribosome-free mRNA. **Mol Microbiol**, 45 (5):1231-1243, 2002.

LI, S. W.; SIERON, A. L.; FERTALA, A.; HOJIMA, Y.; ARNOLD, W. V.; PROCKOP, D. J. The C-proteinase that processes procollagens to fibrillar collagens is identical to the protein previously identified as bone morphogenic protein-1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 93 (10):5127-5130, 1996.

LI, M.; SU, Z. G.; JANSON, J. C. In vitro protein refolding by chromatographic procedures. **Protein Expr Purif**, 33 (1):1-10, 2004.

LOBSTEIN, J.; EMRICH, C. A.; JEANS, C.; FAULKNER, M.; RIGGS, P.; BERKMEN, M. SHuffle, a novel Escherichia coli protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. **Microb Cell Fact**, 11 56, 2012.

LOPEZ, P. J.; MARCHAND, I.; JOYCE, S. A.; DREYFUS, M. The C-terminal half of RNase E, which organizes the Escherichia coli degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo. **Mol Microbiol**, 33 (1):188-199, 1999.

LOPEZ-OTIN, C.; OVERALL, C. M. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 3 (7):509-519, 2002.

LUCATO, R. V., JR.; ABDULKADER, R. C.; BARBARO, K. C.; MENDES, G. E.; CASTRO, I.; BAPTISTA, M. A.; CURY, P. M.; MALHEIROS, D. M.; SCHOR, N.; YU, L.; BURDMANN, E. A. Loxosceles gaucho venom-induced acute kidney injury--in vivo and in vitro studies. **PLoS Negl Trop Dis**, 5 (5):e1182, 2011.

LUCIANO, M. N.; DA SILVA, P. H.; CHAIM, O. M.; DOS SANTOS, V. L.; FRANCO, C. R.; SOARES, M. F.; ZANATA, S. M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of Loxosceles intermedia (brown spider) venom in renal tissue. **J Histochem Cytochem**, 52 (4):455-467, 2004.

LUNG, J. M.; MALLORY, S. B. A child with spider bite and glomerulonephritis: a diagnostic challenge. **Int J Dermatol**, 39 (4):287-289, 2000.

MA, Q.; YU, Z.; HAN, B.; WANG, Q.; ZHANG, R. Expression and purification of lactacin Q by small ubiquitin-related modifier fusion in Escherichia coli. **J Microbiol**, 50 (2):326-331, 2012.

MACHADO, L. F.; LAUGESSEN, S.; BOTELHO, E. D.; RICART, C. A.; FONTES, W.; BARBARO, K. C.; ROEPSTORFF, P.; SOUSA, M. V. Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in Loxosceles gaucho venom. **Proteomics**, 5 (8):2167-2176, 2005.

MACHADO, L. F.; LAUGENSEN, S.; BOTELHO, E. D.; RICART, C. A.; FONTES, W.; BARBARO, K. C.; ROEPSTORFF, P.; SOUSA, M. V. Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. **Proteomics**, 5 (8):2167-2176, 2005.

MADSEN, W.; ELFAR, J. Spider bites. **J Hand Surg Am**, 35 (10):1698-1699, 2010.

MALAKHOV, M. P.; MATTERN, M. R.; MALAKHOVA, O. A.; DRINKER, M.; WEEKS, S. D.; BUTT, T. R. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. **J Struct Funct Genomics**, 5 (1-2):75-86, 2004.

MALAQUE, C. M.; CASTRO-VALENCIA, J. E.; CARDOSO, J. L.; FRANCCA, F. O.; BARBARO, K. C.; FAN, H. W. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in Sao Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 44 (3):139-143, 2002.

MALAQUE, C. M.; SANTORO, M. L.; CARDOSO, J. L.; CONDE, M. R.; NOVAES, C. T.; RISK, J. Y.; FRANCA, F. O.; DE MEDEIROS, C. R.; FAN, H. W. Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. **Toxicon**, 58 (8):664-671, 2011.

MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M. L. [*Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) species distribution in the State of Parana]. **Rev Soc Bras Med Trop**, 38 (4):331-335, 2005.

MARTINEZ, A.; KNAPPSKOG, P. M.; OLAFSDOTTIR, S.; DOSKELAND, A. P.; EIKEN, H. G.; SVEBAK, R. M.; BOZZINI, M.; APOLD, J.; FLATMARK, T. Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in *Escherichia coli* circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. Isolation and characterization of the wild-type enzyme. **Biochem J**, 306 (Pt 2) 589-597, 1995.

MCDADE, J.; AYGUN, B.; WARE, R. E. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) envenomation leading to acute hemolytic anemia in six adolescents. **J Pediatr**, 156 (1):155-157, 2010.

MCGLASSON, D. L.; HARROFF, H. H.; SUTTON, J.; DICK, E.; ELSTON, D. M. Cutaneous and systemic effects of varying doses of brown recluse spider

venom in a rabbit model. **Clin Lab Sci**, 20 (2):99-105, 2007.

MINDER, P.; BAYHA, E.; BECKER-PAULY, C.; STERCHI, E. E. Meprin α transactivates the epidermal growth factor receptor (EGFR) via ligand shedding, thereby enhancing colorectal cancer cell proliferation and migration. **J Biol Chem**, 2012.

MISAWA, S.; KUMAGAI, I. Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies. **Biopolymers**, 51 (4):297-307, 1999.

MONTEIRO, C. L.; RUBEL, R.; COGO, L. L.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Isolation and identification of *Clostridium perfringens* in the venom and fangs of *Loxosceles intermedia* (brown spider): enhancement of the dermonecrotic lesion in loxoscelism. **Toxicon**, 40 (4):409-418, 2002.

OSPEDAL, K. Z.; APPEL, M. H.; FILLUS NETO, J.; MANGILI, O. C.; SANCHES VEIGA, S.; GREMSKI, W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Int J Exp Pathol**, 83 (6):287-294, 2002.

PALUDO, K. S.; BISCAIA, S. M.; CHAIM, O. M.; OTUKI, M. F.; NALIWAICO, K.; DOMBROWSKI, P. A.; FRANCO, C. R.; VEIGA, S. S. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: a pharmacological investigation. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, 149 (3):323-333, 2009.

PAULI, I.; MINOZZO, J. C.; DA SILVA, P. H.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*). **Toxicon**, 53 (6):660-671, 2009.

PAULI, I.; PUKA, J.; GUBERT, I. C.; MINOZZO, J. C. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. **Toxicon**, 48 (2):123-137, 2006.

PEITSCH, M. C. Protein modeling by E-mail. **Biotechnology**, 13: 658 - 660, 1995.

PETERSON, M. E. Brown spider envenomation. **Clin Tech Small Anim Pract**, 21 (4):191-193, 2006.

PFLEIDERER, G.; ZWILNG, R.; SONNEBORN, H. H. [On the evolution of endopeptidases, 3. A protease of molecular weight 11,000 and a trypsin-like

fraction from *Astacus fluviatilis* Fabr]. **Hoppe Seylers Z Physiol Chem**, 348 (10):1319-1331, 1967.

PLATNICK, N. I. The world spider catalog, version 13.5. American Museum of Natural History, online at <http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog>. DOI: 10.5531/db.iz.0001. 2013.

PRAKASH, A.; PARSONS, S. J.; KYLE, S.; MCPHERSON, M. J. Recombinant production of self-assembling SZ-structured peptides using SUMO as a fusion partner. **Microb Cell Fact**, 11 (1):92, 2012.

QIU, J.; SWARTZ, J. R.; GEORGIOU, G. Expression of active human tissue-type plasminogen activator in *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol**, 64 (12):4891-4896, 1998.

QUESADA, V.; SANCHEZ, L. M.; ALVAREZ, J.; LOPEZ-OTIN, C. Identification and characterization of human and mouse ovastacin: a novel metalloproteinase similar to hatching enzymes from arthropods, birds, amphibians, and fish. **J Biol Chem**, 279 (25):26627-26634, 2004.

RASH, L. D.; HODGSON, W. C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. **Toxicon**, 40 (3):225-254, 2002.

REYDA, S.; JACOB, E.; ZWILLING, R.; STOCKER, W. cDNA cloning, bacterial expression, in vitro renaturation and affinity purification of the zinc endopeptidase astacin. **Biochem J**, 344 Pt 3 851-857, 1999.

REYNOLDS, S. D.; ANGERER, L. M.; PALIS, J.; NASIR, A.; ANGERER, R. C. Early mRNAs, spatially restricted along the animal-vegetal axis of sea urchin embryos, include one encoding a protein related to tolloid and BMP-1. **Development**, 114 (3):769-786, 1992.

RIBEIRO, R. O.; CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, L. H.; SADE, Y. B.; PALUDO, K. S.; SENFF-RIBEIRO, A.; DE MOURA, J.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, 50 (8):1162-1174, 2007.

RIBUFFO, D.; SERRATORE, F.; FAMIGLIETTI, M.; GRECO, M.; FOIS, F.;

ATZORI, L.; PAU, M.; ASTE, N. Upper eyelid necrosis and reconstruction after spider bite: case report and review of the literature. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, 16 (3):414-417, 2012.

ROSEN, J. L.; DUMITRU, J. K.; LANGLEY, E. W.; MEADE OLIVIER, C. A. Emergency department death from systemic loxoscelism. **Ann Emerg Med**, 60 (4):439-441, 2012.

ROTHER, M.; WONG, S. C.; HENZEL, W. J.; GOEDDEL, D. V. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. **Cell**, 78 (4):681-692, 1994.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. Zoologia dos Invertebrados. **Editora Roca**, 7 ed. São Paulo, 2005.

SADE, Y. B.; BOIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L. H.; DA SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Int J Biochem Cell Biol**, 44 (1):170-177, 2012.

SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Mol Cell Biochem**, 307 (1-2):249-264, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**, Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 978-087969577-4. 2001.

SAMS, H. H.; DUNNICK, C. A.; SMITH, M. L.; KING, L. E., JR. Necrotic arachnidism. **J Am Acad Dermatol**, 44 (4):561-573; quiz 573-566, 2001.

SANDIDGE, J. S. Arachnology: scavenging by brown recluse spiders. **Nature**, 426 (6962):30, 2003.

SATAKARNI, M.; CURTIS, R. Production of recombinant peptides as fusions with SUMO. **Protein Expr Purif**, 78 (2):113-119, 2011.

SATO, S. M.; SARGENT, T. D. Molecular approach to dorsoanterior development in *Xenopus laevis*. **Dev Biol**, 137 (1):135-141, 1990.

SAUPE, E. E.; PAPES, M.; SELDEN, P. A.; VETTER, R. S. Tracking a medically important spider: climate change, ecological niche modeling, and the brown recluse (*Loxosceles reclusa*). **PLoS One**, 6 (3):e17731, 2011.

SCHENONE, H. [Toxic pictures produced spiders bites in Chile: latrodectism and loxoscelism]. **Rev Med Chil**, 131 (4):437-444, 2003.

SCHENONE, H.; SAAVEDRA, T.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F. [Loxoscelism in Chile. Epidemiologic, clinical and experimental studies]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 31 (6):403-415, 1989.

SCHROEDER, F. C.; TAGGI, A. E.; GRONQUIST, M.; MALIK, R. U.; GRANT, J. B.; EISNER, T.; MEINWALD, J. NMR-spectroscopic screening of spider venom reveals sulfated nucleosides as major components for the brown recluse and related species. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105 (38):14283-14287, 2008.

SCHUTTE, A.; HEDRICH, J.; STOCKER, W.; BECKER-PAULY, C. Let it flow: Morpholino knockdown in zebrafish embryos reveals a pro-angiogenic effect of the metalloprotease meprin alpha2. **PLoS One**, 5 (1):e8835, 2010.

SENFF-RIBEIRO, A.; HENRIQUE DA SILVA, P.; CHAIM, O. M.; GREMSKI, L. H.; PALUDO, K. S.; BERTONI DA SILVEIRA, R.; GREMSKI, W.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. **Biotechnol Adv**, 26 (3):210-218, 2008.

SEZERINO, U. M.; ZANNIN, M.; COELHO, L. K.; GONCALVES JUNIOR, J.; GRANDO, M.; MATTOSINHO, S. G.; CARDOSO, J. L.; VON EICKSTEDT, V. R.; FRANCA, F. O.; BARBARO, K. C.; FAN, H. W. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 92 (5):546-548, 1998.

SHIMELL, M. J.; FERGUSON, E. L.; CHILDS, S. R.; O'CONNOR, M. B. The *Drosophila* dorsal-ventral patterning gene *tolloid* is related to human bone morphogenetic protein 1. **Cell**, 67 (3):469-481, 1991.

STERCHI, E. E. Special issue: metzincin metalloproteinases. **Mol Aspects Med**, 29 (5):255-257, 2008.

STERCHI, E. E.; STOCKER, W.; BOND, J. S. Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases. **Mol Aspects Med**, 29 (5):309-328, 2008.

STOCKER, W.; BODE, W. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. **Curr Opin Struct Biol**, 5 (3):383-390, 1995.

STOCKER, W.; GOMIS-RUTH, F. X.; BODE, W.; ZWILLING, R. Implications of the three-dimensional structure of astacin for the structure and function of the astacin family of zinc-endopeptidases. **Eur J Biochem**, 214 (1):215-231, 1993.

STOCKER, W.; GRAMS, F.; BAUMANN, U.; REINEMER, P.; GOMIS-RUTH, F. X.; MCKAY, D. B.; BODE, W. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein Sci**, 4 (5):823-840, 1995.

STOCKER, W.; SAUER, B.; ZWILLING, R. Kinetics of nitroanilide cleavage by astacin. **Biol Chem Hoppe Seyler**, 372 (6):385-392, 1991.

STOECKER, W. V.; GREEN, J. A.; GOMEZ, H. F. Diagnosis of loxoscelism in a child confirmed with an enzyme-linked immunosorbent assay and noninvasive tissue sampling. **J Am Acad Dermatol**, 55 (5):888-890, 2006.

STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **J Mol Biol**, 189 (1):113-130, 1986.

SWANSON, D. L.; VETTER, R. S. Loxoscelism. **Clin Dermatol**, 24 (3):213-221, 2006.

TAMBOURGI, D. V.; GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M.; VAN DEN BERG, C. W. Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies. **Toxicon**, 56 (7):1113-1119, 2010.

TANG, S.; WU, J.; ZHAO, X.; WANG, H.; QIU, Z.; SHEN, X.; GUO, X. Molecular cloning and characterization of hatching enzyme-like genell (BmHELII) in the silkworm, *Bombyx mori*. **Biochem Biophys Res Commun**, 419 (2):194-199, 2012.

TITANI, K.; TORFF, H. J.; HORMEL, S.; KUMAR, S.; WALSH, K. A.; RODL, J.; NEURATH, H.; ZWILLING, R. Amino acid sequence of a unique protease from the crayfish *Astacus fluviatilis*. **Biochemistry**, 26 (1):222-226, 1987.

TREVISAN-SILVA, D.; GREMSKI, L. H.; CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; MEISSNER, G. O.; MANGILI, O. C.; BARBARO, K. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; SENFF-RIBEIRO, A. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). **Biochimie**, 92 (1):21-32, 2010.

VEIGA, S. S.; DA SILVEIRA, R. B.; DREYFUS, J. L.; HAOACH, J.; PEREIRA, A. M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, 38 (6):825-839, 2000.

VEIGA, S. S.; FEITOSA, L.; DOS SANTOS, V. L.; DE SOUZA, G. A.; RIBEIRO, A. S.; MANGILI, O. C.; PORCIONATTO, M. A.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P.; BRENTANI, R. R.; GREMSKI, W. Effect of brown spider venom on basement membrane structures. **Histochem J**, 32 (7):397-408, 2000.

VEIGA, S. S.; GREMSKI, W.; DOS SANTOS, V. L.; FEITOSA, L.; MANGILI, O. C.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P.; BRENTANI, R. R. Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom proteins: dependence on glycosylation for dermonecrotic activity. **Toxicon**, 37 (4):587-607, 1999.

VEIGA, S. S.; ZANETTI, V. C.; BRAZ, A.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. **Braz J Med Biol Res**, 34 (7):843-850, 2001.

VEIGA, S. S.; ZANETTI, V. C.; FRANCO, C. R.; TRINDADE, E. S.; PORCIONATTO, M. A.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. **Thromb Res**, 102 (3):229-237, 2001.

VETTER, R. S. Seasonality of brown recluse spiders, *Loxosceles reclusa*, submitted by the general public: implications for physicians regarding loxoscelism diagnoses. **Toxicon**, 58 (8):623-625, 2011.

VETTER, R. S.; ISBISTER, G. K. Medical aspects of spider bites. **Annu Rev Entomol**, 53 409-429, 2008.

VETTER, R. S.; VISSCHER, P. K. Bites and stings of medically important venomous arthropods. **Int J Dermatol**, 37 (7):481-496, 1998.

WANG, Q.; MEI, C.; ZHEN, H.; ZHU, J. Codon preference optimization increases prokaryotic cystatin C expression. **J Biomed Biotechnol**, 2012 732017, 2012.

WANG, Z.; LI, N.; WANG, Y.; WU, Y.; MU, T.; ZHENG, Y.; HUANG, L.; FANG, X. Ubiquitin-intein and SUMO2-intein fusion systems for enhanced protein production and purification. **Protein Expr Purif**, 82 (1):174-178, 2012.

WASSERMAN, G. S.; ANDERSON, P. C. Loxoscelism and necrotic arachnidism. **J Toxicol Clin Toxicol**, 21 (4-5):451-472, 1983.

WEST, S. M.; CHAUDHURI, J. B.; HOWELL, J. A. Improved protein refolding using hollow-fibre membrane dialysis. **Biotechnol Bioeng**, 57 (5):590-599, 1998.

WRIGHT, S. W.; WRENN, K. D.; MURRAY, L.; SEGER, D. Clinical presentation and outcome of brown recluse spider bite. **Ann Emerg Med**, 30 (1):28-32, 1997.

YAN, L.; FEI, K.; ZHANG, J.; DEXTER, S.; SARRAS, M. P., JR. Identification and characterization of hydra metalloproteinase 2 (HMP2): a meprin-like astacin metalloproteinase that functions in foot morphogenesis. **Development**, 127 (1):129-141, 2000.

YAN, L.; LEONTOVICH, A.; FEI, K.; SARRAS, M. P., JR. Hydra metalloproteinase 1: a secreted astacin metalloproteinase whose apical axis expression is differentially regulated during head regeneration. **Dev Biol**, 219 (1):115-128, 2000.

YANG, H.; CHEN, J.; YANG, G.; ZHANG, X. H.; LI, Y. Mutational analysis of the zinc metalloprotease EmpA of *Vibrio anguillarum*. **FEMS Microbiol Lett**, 267 (1):56-63, 2007.

YASUMASU, S.; YAMADA, K.; AKASAKA, K.; MITSUNAGA, K.; IUCHI, I.; SHIMADA, H.; YAMAGAMI, K. Isolation of cDNAs for LCE and HCE, two constituent proteases of the hatching enzyme of *Oryzias latipes*, and concurrent expression of their mRNAs during development. **Dev Biol**, 153 (2):250-258, 1992.

YIALLOUROS, I.; KAPPELHOFF, R.; SCHILLING, O.; WEGMANN, F.; HELMS, M. W.; AUGE, A.; BRACHTENDORF, G.; BERKHOFF, E. G.; BEERMANN, B.; HINZ, H. J.; KONIG, S.; PETER-KATALINIC, J.; STOCKER, W. Activation mechanism of pro-astacin: role of the pro-peptide, tryptic and autoproteolytic cleavage and importance of precise amino-terminal processing. **J Mol Biol**, 324 (2):237-246, 2002.

YOKOZAWA, Y.; TAMAI, H.; TATEWAKI, S.; TAJIMA, T.; TSUCHIYA, T.; KANZAWA, N. Cloning and biochemical characterization of astacin-like squid metalloprotease. **J Biochem**, 132 (5):751-758, 2002.

YOUNG, A. R.; PINCUS, S. J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. **Toxicon**, 39 (2-3):391-400, 2001.

ZANETTI, V. C.; DA SILVEIRA, R. B.; DREYFUSS, J. L.; HAOACH, J.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. **Blood Coagul Fibrinolysis**, 13 (2):135-148, 2002.

ZAPATA, J. M.; PAWLOWSKI, K.; HAAS, E.; WARE, C. F.; GODZIK, A.; REED, J. C. A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains. **J Biol Chem**, 276 (26):24242-24252, 2001.